

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS  
EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

---

# PROYECCION BIOLOGICA DE LOS LIPIDOS

DISCURSO

LEIDO EN EL ACTO DE SU RECEPCION

POR EL

Excmo. Sr. D. ANGEL MARTIN MUNICIO

Y

CONTESTACION

DEL

Excmo. Sr. D. FLORENCIO BUSTINZA LACHIONDO

EL DIA 11 DE FEBRERO DE 1969



MADRID

DOMICILIO DE LA ACADEMIA:

VALVERDE, 22. TELEFONO 221 25 29

1969

Depósito legal: M. 2.393-1969

---

Imp. ROMERO-REQUEJO, S. L. - Ardemán, 65 - Madrid, 1969

# DISCURSO

DEL

EXCMO. SR. D. ANGEL MARTIN MUNICIO

•PROYECCION BIOLOGICA DE LOS LIPIDOS•

Excmo. Señor Presidente,  
Excmos. Señores Académicos,  
Señoras, Señores,

Ya, cuando a falta de pocas semanas para esta ocasión solemne, feliz, y al escribir estos renglones venía pensando en estas primeras palabras, al llegar en mi meditación hasta este preciso momento adivinaba —sin duda— cómo habrían de borbotear un conjunto de sentimientos. Sensaciones en las que se entremezclan la ejemplar contemplación de vidas consagradas a la ciencia con diálogos mudos entre recuerdos que pregonan la devoción a los maestros y la gratitud a las enseñanzas recibidas, que confunden también la alegría sincera por vuestra magnánima propuesta y elección, la satisfacción con que os agradezco este privilegio con el afectivo y formal recuerdo de mi antecesor en esta Real Academia.

De todos estos sentimientos, sin orden, profundos, deseo dejar constancia entrañable en este acto. Mas como la preceptiva invocación al académico desaparecido hace siempre correr el riesgo de una fría interpretación protocolaria, yo quisiera —para evitarlo— dedicar al Profesor D. Gonzalo Ceballos la investigación inédita que se recoge en este discurso con que hoy se transmite su medalla.

Quisiera con ello hacer más singular la continuidad y más delicada esta ofrenda, en la que incluimos una serie de resultados originales sobre Bioquímica del desarrollo y metamorfosis de insectos. Porque fue la Entomología la ciencia en que el Profesor Ceballos desarrolló su triple actividad principal, y en sus publicaciones pueden leerse afirmaciones tales que "... sus filogenias se discuten...", "... respecto a su filogenia, poco se puede decir...", "... varios aspectos morfológicos confunden a los especialistas...", "... el concepto de especie es muy confuso y difuso...", como manifestaciones de una investigación sistemática pura

que nos ofreció el contrapunto de una concepción biológica distinta, es cierto, de la que hoy vais a escuchar, antecesora también en el tiempo a los desarrollos moleculares, mas siempre trascendente porque el escudriñamiento de la naturaleza fue hecho con solidez, seriedad, constancia y rigor científicos.

Su trabajo "Himenópteros de España", premiado en 1921 por esta Real Academia, supuso la iniciación de un prolongado estudio sobre este orden, especialmente de la familia Icneumonidos, que culminan en sus publicaciones "Las tribus de los Himenópteros de España (1943) y "Catálogo de los Himenópteros de España" (1956), y que con el título "Consideraciones sobre el orden Hymenoptera y su conocimiento en España" resumió en el acto de su recepción en esta Academia en 1962.

En 1917 se incorporó el Profesor Ceballos a la Sección de Entomología del Museo Nacional de Ciencias Naturales, y en 1941 fue Director fundador del Instituto Español de Entomología.

Y dejo adrede para el tercer lugar la mención que sea el homenaje al magisterio de la ciencia que vive y que crea el Profesor Ceballos. Desde 1934, Profesor de Zoología y Entomología de la Escuela Especial de Ingenieros de Montes, labor plasmada en sus obras "Elementos de Entomología General" y "Zoología General".

A su figura científica y humana sea dedicado, en este acto, el homenaje con que veneramos su memoria.

Y bajo este recuerdo pasemos al tema de la recepción:

#### PROYECCION BIOLOGICA DE LOS LIPIDOS

Formando parte de todos los organismos vivos se encuentra una notable variedad de compuestos, conocidos bajo la denominación de lípidos —triglicéridos, fosfolípidos y esterés de colesterol de modo más importante—, que de modo cuantitativo pueden llegar a representar hasta el cincuenta por ciento de su peso y en cuya composición participan universalmente los ácidos grasos.

A través de toda la escala filogenética va surgiendo una mayor complicación en la visión general de la biosíntesis de los lípidos, especialmente de aquellos que cumplen en los organismos funciones reguladoras. Su función va a ser múltiple y trascendente, y en el orden estructural, una gran variedad de ácidos grasos exhibe una diferenciación evolutiva.

Hace ya doscientos millones de años (S. K. Das y R. S. Harris, *Proc. int. Ass. Dental Res.*, 67, 1966) que existían las estructuras de nuestros actuales ácidos grasos. Lecitinas no se han detectado hasta el Pleistoceno, y en el mismo período aparecen los esterés de colesterol; fosfatidiletanolamina se ha aislado ya de fósiles óseos de los períodos Cretáceo y Jurásico, pero la presencia de ácidos grasos en algas fósiles se remonta a los Cámbrico y Precámbrico con hasta varios miles de millones de años de antigüedad.

Presencia de lípidos en restos fósiles que va a plantear cuestiones generales de evaluación difícil; entre ellas, su origen en el fósil mismo y los posibles intercambios con la roca matriz, así como las posibilidades que estas determinaciones ofrecen para caracterizar formas primitivas de vida y para contribuir al mejor conocimiento de los esquemas evolutivos (J. M. Everts, A. R. Doberenz y R. W. G. Wyckoff, *Comp. Biochem. Physiol.*, 26, 955, 1968).

La materia orgánica de los antiguos sedimentos, carente de ácidos grasos ramificados, deriva de las algas verde-azules y ha sido preservada sin modificaciones (P. L. Parker, Ch. van Baalen y L. Maurer, *Science*, 155, 707, 1967). Los ácidos grasos ramificados isoprenoides (fitánico -3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico; pristánico -2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico) tienen su origen en la fracción de fitol de la clorofila biosintetizada en el Eoceno (I. MacLean, G. Eglinton, K. Douraghi-Zadeh, R. G. Askman y S. N. Hooper, *Nature*, 218, 1019, 1968); origen establecido en la comparación de la estereoquímica de los centros asimétricos de estos ácidos presentes en los actuales animales marinos y terrestres y en los procedentes de restos fósiles de cincuenta a sesenta millones de años.

Acerca de los mecanismos de biosíntesis, análisis comparados de la distribución de deuterio en ácidos grasos procedentes de restos fósiles y del agua de su entorno (G. Zborowski, L. Ponticorvo y D. Rittenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58, 1660, 1967), han permitido aportar pruebas de su constancia al menos en los últimos diez millones de años.

Desde esta anonadante antigüedad hemos de trasladarnos a la iniciación del

siglo actual para poder observar la plentitud de desarrollo del estudio de los materiales orgánicos constituyentes de los seres vivos. Materiales que se habían venido aislando desde el siglo XVIII —los ácidos tartárico, cítrico, úrico, etcétera— o sintetizando desde el siguiente XIX —a partir de la obtención de la urea—. El ácido oléico, por ejemplo, se descubre en 1815, pero su estructura no se aclara hasta 1894. La naturaleza química de las grasas precedió en su conocimiento al de proteínas e hidratos de carbono; en 1823, Chevreul establece que las grasas animales y vegetales son combinaciones de glicerina con ácidos grasos, pero hasta los últimos años del siglo XIX y primeros del XX no se conoce con Emil Fischer el engarzamiento peptídico de los aminoácidos en las moléculas de proteínas, y hasta los mismos años permanece oscura la naturaleza química de los hidratos de carbono.

En 1812, Vauquelin anota la presencia de fósforo unido a las grasas de cerebro; dato primero en la descripción de uno de los grupos de lípidos cuya caracterización y síntesis ha exigido un esfuerzo que se prolonga hasta nuestros días y que en 1916 hizo comentar a Levene cómo para obtener una esfingomielina en ciertas condiciones de pureza eran necesarias más de treinta recristalizaciones.

Mas al lado de estas simples observaciones químicas, pudo ya también en el siglo pasado entreverse su proyección futura, de manera imprecisa ciertamente y con lenguaje simbólico, pero en 1884 (J. L. W. Thudichum, "A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain", Ballière, Tindall and Cox, Londres, 1884) pudo ya insinuarse, "... tanto en animales como en plantas, los fosfátidos son el centro, la vida y el alma química del bioplasma..."

Todo ello iba a desembocar, en su conjunto, a la definición de los constituyentes químicos participantes de los procesos fisiológicos y, en su consecuencia, los problemas de la fisiología de las funciones orgánicas o celulares humanas, animales, vegetales y de microorganismos van a estar íntimamente unidos a problemas químicos. Esta influencia va, en las últimas décadas, a liberar a la Biología de su confinamiento como ciencia únicamente descriptiva.

De esta manera, la química de los lípidos va a suministrarnos en la actualidad una gran variedad de ácidos grasos, libres o insertados en un amplio y diverso grupo de estructuras químicas.

Esta diversidad estructural y la multiplicidad de tratamientos que van desde la Química y la Química-Física a la Fisiología y la Patología han sido capaces de exhibir en los últimos años una extensión y una profundidad bien notorias. Es cierto que casi lo mismo pudiera insinuarse de otras muy variadas facetas del terreno bioquímico y no lo es menos que la naturaleza interdisciplinaria de la evaluación crítica de los problemas biológicos es hoy una constante común de todos ellos. Pero los lípidos, a pesar de la ventaja que pudiera haber su-

puesto el más anticipado conocimiento de su estructura, fueron quedando rezagados en la investigación científica de la primera mitad del siglo actual. Los métodos de análisis y purificación, aplicables entonces a proteínas e hidratos de carbono y sus productos de hidrólisis, no exhibían prácticamente vigor en el caso de los lípidos; la naturaleza compleja de sus mezclas no podía resolverse con el tecnicismo disponible.

Por ello, casi hasta la última década los lípidos han permanecido más ignorados, más inasequibles en sus tratamientos experimentales, más desconocidos en su significación fisiológica y, por ello, la transición ha sido ---quizá--- más brusca y más pronunciada está siendo su incursión en el terreno biológico.

En la dilucidación de sus estructuras, la enorme potencia de las actuales técnicas analíticas se une a la determinación de las especies moleculares individuales. Las moléculas de lípidos son capaces de exhibir propiedades poco frecuentes.

Las relaciones de estas sustancias en la escala filogenética comienzan a ser tenidas en cuenta y se descubren características estructurales definidoras de especies.

Sus transformaciones en la ontogénesis y en el desarrollo inician su investigación.

Los mecanismos de su digestión, transporte, metabolismo y regulación han sido profundamente estudiados en sus líneas generales.

El conocimiento de su asociación con las proteínas se ha potenciado en múltiples direcciones; y así se penetra en la participación de las lipoproteínas en los mecanismos de transporte y en la estructura de biomembranas con su trascendente significado biológico. se conocen actividades enzimáticas asociadas con esta interacción y es necesario atribuir al conjunto la especificidad propia de las proteínas.

Su íntima relación con los fenómenos de aterosclerosis y alteraciones coronarias ---cuya amplitud y repercusión no es menester subrayar--- proyecta cada día con más vigor el interés de su estudio y la importancia de los aspectos nutricionales.

Va sucediéndose el descubrimiento de alteraciones en las distintas facetas de su metabolismo, muchas de ellas congénitas, y con sus versiones genética, bioquímica y clínica enriquecen la Patología Molecular.

Al resaltar de esta manera una serie de implicaciones en el estado actual de los lípidos, más que hacer historia pretendemos que sirvan de hitos con que

enmarcar la magnitud de su proyección; y ante la inadecuación en este momento de un estudio profundo y particular, quisiéramos significar en su amplitud la tendencia reunificadora de las ciencias físicas y biológicas que en la última década ha constituido uno de los más acusados desarrollos científicos. Esta reunificación, como consecuencia del progreso de la Ciencia, ha tenido lugar a modo de un movimiento en espiral que, si bien acerca a estadios antiguos, reaparecen enriquecidas las concepciones y muchas veces fundidas aquellas otras que en su origen pudieron parecer contradictorias.

El interés que los químicos y físicos manifiestan por los sistemas biológicos, la importancia que los químicos puros conceden al estudio de las moléculas biológicas; y, frente a ello, la necesidad de los biólogos por la utilización de los métodos químicos y químico-físicos y el convencimiento de que el progreso en numerosos campos de la Biología depende de los tratamientos moleculares físicos y químicos, son hechos indudables que subyacen a esta tendencia unificadora y que otorga a la Biología en general su extraordinario auge.

Es cierto que conveniencias administrativas o pedagógicas puedan definir el criterio de que los microbiólogos utilizan microorganismos en su investigación, los botánicos, plantas, y virus, los virólogos. Pero mucho más importante que este objeto es el tipo de tratamientos con que nos enfrentamos con los problemas científicos; tratamientos de los diferentes organismos vivos que van desde el nivel de poblaciones al de moléculas, pasando por individuos, órganos, tejidos y células. Y son todos estos niveles los que van a servirnos para nuestro enfrentamiento con la proyección biológica de los lípidos y a la vez para meditar en la naturaleza biológica de la mayoría de los problemas básicos que hoy nos afectan, y también para pregonar que la reciente y actual investigación biológica, en su enorme potencia, ha borrado su anterior falta de desarrollo, que ha sido definida como uno de los más cruciales errores en la historia de la humanidad ("Science and the future of the mankind", ed. H. Boyko, W. Junk, Pub., La Haya, 1964).

Mas si hace unos momentos contemplábamos un vacío escalofriante, geológico, desde la aparición de los ácidos grasos en la tierra, y aún podemos sentirlo al considerar la variación en la acumulación de un conocimiento científico superior desde que hace seis mil años emergieron las primeras civilizaciones Neolíticas del Mediterráneo, no deja de ser menos grandiosa la previsión —por incógnita y por fascinante— de lo que en las épocas venideras puede llegar a ser la ultra-Biología ("Personal Knowledge. Towards a post-critical Philosophy", M. Polanyi, Chicago, 1958), extrapolación última de la Biología, contemplada desde nuestro último cuarto de siglo.

En este corto tiempo, más o menos el medio por ciento de la vida civilizada del hombre, el avance triunfal de la Biología quizá sólo tenga parangón

en la Física Nuclear y, como ésta, se enfrenta con valores espirituales cuyo predicamiento no reconoce, porque la ciencia actual no ve fronteras ni limitaciones a su actividad.

En este avance, la Biología no se contenta con la comprensión de la vida, no la respeta y desea alterarla; conserva el mismo paralelismo con la Física Nuclear en su balance de beneficios reales y peligros potenciales portentosos. Peligros que no cuesta mucho vislumbrar ("The Scientific Conscience", C. Roberts, Ed. G. Braziller, N. Y., 1967) en la reducción del concepto de vida a una serie de abstracciones químicas, físicas y matemáticas, en el último control de nuestro destino físico por la regulación artificial de la distribución de genes humanos y en la sobreestimación del valor último de la Biología, con la consiguiente degradación de los ideales humanísticos. Beneficios en la realidad del descubrimiento de nuevos hechos y generalizaciones biológicas, en una mejor comprensión de los fenómenos vitales con su papel definitivo en la mejora del bienestar humano, en el alivio del sufrimiento y la privación a través del progreso de la Medicina y la Agricultura.

Los lípidos, como las más importantes moléculas biológicas, van a participar de estas dos proyecciones. Contribuirán, no cabe duda, a elaborar la idea de vida como expresión de las propiedades de la materia en un estado físico particular y a expresar este estado por leyes matemáticas; pero salvando lo que de incompatibilidad pueda existir entre progreso científico y humano, la previsión de progreso y beneficio científicos ofrece para la Biología de los lípidos una perspectiva llena de oportunidades y, entre otras, se interrelacionarán las manifestaciones clínicas de sus múltiples y variadas disfunciones con la Bioquímica de sus fundamentos y las causas de su origen.

\* \* \*

Esta evolución en el significado general de los lípidos en Biología, ha venido concretándose en los organismos animales y vegetales en toda una ordenación funcional que trata de conjugarse con sus complejas estructuras. Algunas se *acumulan en las células de organismos* uni- y multicelulares, fruto de una producción excesiva, y sirven de reserva energética. Reserva que cualitativa y cuantitativamente va a variar con el estado fisiológico del organismo en general o del órgano en particular y, así, se incrementan de modo notable en procesos particulares de ciertas especies como hibernación, migraciones, etc.

Otras estructuras lipídicas son esenciales a la *integridad estructural y actividades metabólicas de las membranas* celulares y de las membranas de las partículas celulares —mitocondrias, cloroplastos, etc.— y la naturaleza de los lípidos influencia las propiedades de permeabilidad y transporte y suministra a las

proteínas la configuración que exige su actividad catalítica. La participación de los lípidos en la estructura y función mitocondriales adquiere especial relieve en el transporte biológico de la energía. Los cambios en los lípidos de la superficie de las membranas llegan a afectar la morfología viral. Muchas de las propiedades biológicas de las membranas pueden interpretarse en términos de la química y la física de los lípidos e incluso distintos modelos de membrana sirven para correlacionar las propiedades de las membranas naturales con la conducta de los lípidos puros (G. Sessa y G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, 9, 310, 1968), pero ninguno de ellos es capaz aún de explicar todos los aspectos conocidos. Y como dato de actualidad, los aloantígenos, implicados en los problemas de la histocompatibilidad, que incitan una respuesta inmune cuando se transfieren dentro de las especies, están localizados en la superficie de las membranas bajo la forma de complejos lipoprotéicos insolubles (L. A. Manson, C. A. Hickey y J. Palm, "H-2-alloantigen content of surface membrane of mouse cells, en "Biological properties of the mammalian surface membrane", ed. L. A. Manson, Wistar Inst. Symp. Monograph, núm. 8, pág. 93, 1968).

El problema de las membranas biológicas, las relaciones entre su estructura y función, constituyen hoy y posiblemente por bastante tiempo una de las cuestiones de más difícil tratamiento de la Biología Molecular; biogénesis de estas membranas que habrá de ir ligada a la dinámica de los fosfolípidos en su seno. Y cuando se llegue a definir la relación a nivel molecular de la estructura y función de las membranas, tendremos en nuestras manos —como ha dicho Britton Chance (Proceedings of Sigrid Jusélius Foundation Symposium on "Regulatory Functions of Biological Membranes", Helsinki, 1967)— la solución de los problemas de la bioenergética, la electrofisiología, la reproducción, el crecimiento y la función mental.

Otro grupo de lípidos cumple diversas *funciones metabólicas específicas*, conocidas en algunos casos, pero aún desconocidas en la mayoría; ciertas enzimas exigen la presencia de lípidos definidos para su actividad, se ha averiguado su función transportadora en el plasma, cada día se conoce con más detalle la contribución de los lípidos en la secuencia de la coagulación y su papel en algunas reacciones inmunológicas; pero a pesar de la abundancia de lípidos en el tejido nervioso, no ha podido correlacionarse su presencia individual con la realización de funciones específicas.

Si bien —como ya se ha señalado— los lípidos figuran entre los primeros productos naturales examinados (M. E. Chevreul, "Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale", Levrault, Paris, 1823), el reconocimiento del significado de los constituyentes cuantitativamente menores y todo el reciente florecimiento de la bioquímica de los lípidos ha sido posible merced al desarrollo de un elevado grado de tecnicismo en su metodología experimental; tecni-

cismo desarrollado unas veces para la propia resolución de estos problemas y otras utilizando adecuaciones para la aplicación particular de métodos más generales.

Muchos tipos de NUEVAS TÉCNICAS se vienen utilizando para la separación de lípidos de mezclas complejas, caso muy general en este campo.

Como quiera que gran parte de los lípidos se encuentran bajo la forma compleja de lipoproteínas, la separación de éstas será previa en ciertos casos al conocimiento de sus componentes lipídicos. *Separación* que se lleva a cabo por sedimentación diferencial, reflejo de las diferentes densidades de los componentes, atendiendo a una flotación distinta en una solución de densidad uniforme, a una separación en zonas isopícnicas con un gradiente de densidad del disolvente o a una combinación de ambos (N. G. Anderson, A. I. Lansing, I. Lieberman, C. T. Rankin y H. Elrod, en "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane", ed. L. A. Manson, Wistar Inst. Symp. Monograph, núm. 8, página 23, 1968). La importancia bioquímica y clínica de este tipo de macromoléculas, con sus especiales características físicas, ha llevado a un conocimiento cada vez más preciso de su distribución en suero y de sus variaciones bajo influencias diversas. Debido en muy gran parte a limitaciones técnicas, la separación en la ultracentrífuga de las lipoproteínas se ha llevado a cabo en zonas concretas de intervalos de  $S_r$ . Sin embargo, cada una de estas porciones supone un espectro continuo de partículas a base de diferencias en tamaño, peso molecular y densidad y el conocimiento de la distribución de las partículas exige un especial procesamiento de datos; con la utilización de los ordenadores, los resultados analíticos serán enteramente reales y más aprovechables en la interpretación de las variaciones patológicas, cuyo fundamento reside algunas veces en las interrelaciones entre clases de lipoproteínas.

Esta utilización de los ordenadores analógicos o digitales no es sino un ejemplo de su cada vez más amplio empleo en cuestiones bioquímicas, simulación de sistemas enzimáticos, evolución con el tiempo de reacciones bioquímicas resolviendo de modo simultáneo gran número de ecuaciones diferenciales de la variación de concentración en función del tiempo, mecanismos de control de procesos metabólicos complejos que abren un área nueva al estudio de la regulación bioquímica, etc. En el caso de organismos vivos sencillos, cuyas transformaciones bioquímicas suponen un relativamente pequeño número de sistemas enzimáticos, es posible una representación completa de su metabolismo que habrá de incluir la síntesis y degradación de proteínas, la regulación genética, la cinética enzimática del transporte a través de las membranas. Esta integración de los fenómenos bioquímicos vitales conducirá al diseño de modelos para la experimentación bioquímica y será de gran utilidad en casos —microorganismos, por ejemplo— en que la modificación de las actividades metabó-

licas, de los sustratos, de la inducción, de la represión, etc. puede conducir a la acumulación de sustancias, aminoácidos, azúcares, vitaminas, etc. de importancia nutritiva.

Cada una de estas fracciones de lipoproteínas *puede ser extraída* con distintos sistemas de disolventes orgánicos según los procedimientos generales de aislamiento de lípidos a partir de los más diversos sistemas biológicos. Los extractos complejos de lípidos, a partir de lipoproteínas o de cualquier otro origen, pueden *fraccionarse* e incluso analizarse como tal mezcla por espectroscopía infrarroja, que va a permitir estimar la cantidad de lípidos totales y la participación en ella de ácidos grasos esterificados totales, fosfolípidos y colesterol total (N. K. Freeman, *An. N. Y. Acad. Sci.*, 69, 131, 1957; *J. Lipid Res.*, 5, 236, 1964), con un tres por ciento máximo de error en relación a la determinación gravimétrica.

Las mezclas complejas de lípidos *se fraccionan* de modo fundamental haciendo uso de técnicas cromatográficas en columna y preparativa en capa fina, utilizando una diversidad de adsorbentes, sistemas de desarrollo y reveladores. Ello va a permitir la separación no sólo de las distintas clases de lípidos —mono, di y triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, etc.—, sino de las familias de componentes de algunas de ellas —fosfatidilcolina, -etanolamina, -serina, lisoderivados, esfingomielinas, gangliósidos, etc.— e incluso llegar a la ulterior separación de éstas de acuerdo con la existencia de formas isómeras —1,2 y 1,3-diglicéridos, isómeros cis-trans, etc.— o con la naturaleza y posición de los ácidos grasos —trioleína, trilinoleína, 1-oleodiestearina, 1-estearodioleína, 2-oleodiestearina, etc.—.

La *naturaleza de las mezclas de ácidos grasos* integrados en la estructura de estos constituyentes lipídicos ha podido reconocerse en muchos casos por simple cromatografía en fase de vapor. Técnica ésta que viene contribuyendo de modo extraordinario al estudio de los lípidos, bien aislada o en conjunción con procedimientos espectroscópicos: *ultravioleta*, con el conocimiento de los enlaces conjugados no saturados, la diferencia de isómeros geométricos, la presencia de enlaces acetilénicos; *infrarrojo*, con sus posibilidades de examen en estado sólido, en solución, líquido y vapor, suministra una gran cantidad de información adicional como grupos carboxilo y ester, ramificaciones, fosfoderivados, polimorfismo, etc.; *resonancia magnética nuclear* de alta resolución que caracteriza alcoholes alifáticos, longitud de las cadenas, ramificaciones, estructuras cíclicas en los ácidos grasos, etc. y que además suministra datos en el estudio de las asociaciones moleculares en las membranas celulares y estructuras de lipoproteínas; *de masas*, cuya potencialidad enorme, aún en desarrollo, viene permitiendo la dilucidación de nuevas estructuras de interés biológico.

Los estudios de *difracción de rayos X* se han utilizado para observar la dis-

posición molecular de los lípidos y el conocimiento de su estereoquímica y de las formas polimórficas, así como de las estructuras de lipoproteínas de membranas.

La aplicación de esta metodología ha permitido en los últimos años el conocimiento de nuevas estructuras lipídicas y el singular avance de la Bioquímica y la Biofísica de los lípidos. En el primer aspecto valga la simple mención de los ácidos ciclopropánicos bacterianos (E. Lederer, *Proc. VI Int. Cong. Biochem.*, 63, 1964), de protozoos (H. Meyer y G. G. Holz, *J. Biol. Chem.*, 241, 5000, 1966) y plantas superiores (A. R. Johnson, *Lipids*, 2, 308, 1967); los nuevos sulfolípidos microbianos y de protozoos (G. L. Mayers y T. H. Haines, *Biochemistry*, 6, 1665, 1967); el lípido carcinogénico, carcinolipina, que estimula la síntesis de proteínas, identificado como 14-metil-hexadecanoato de colesterilo (J. Hradec y L. Dolejs, *Biochem. J.*, 107, 129, 1968); los fosfolípidos renales que unidos a  $\beta$ -hidroxiaminoácidos inhiben la producción de angiotensina (S. Sen, R. R. Smeby y F. M. Bumpus, *Biochemistry*, 6, 1572, 1967), etc.

Pero con frecuencia, las distintas clases de lípidos que integran su clasificación constituyen verdaderas familias de compuestos resultantes de la variación individual de los ácidos grasos, más complejas a medida que aumenta el número de ácidos grasos en las estructuras.

El estudio de la distribución posicional de los ácidos grasos o, con más profundidad aún, de las denominadas especies moleculares individuales, poseen, de un lado, la interesante metodología experimental para su averiguación y, de otro, la interpretación bioquímica de los resultados, hoy en sus comienzos.

Diversos métodos cromatográficos sobre ácido silícico han permitido la separación parcial de LECITINAS y CEFALINAS (D. N. Rhodes y C. H. Lea, *II Int. Conf. Biochem. Prob. Lipids*, 73, 1955; P. M. Harris, D. S. Robinson y G. Getz, *Nature*, 188, 742, 1960; E. Baer, D. Buchnea y T. Graf, *Can. J. Biochem.*, 38, 853, 1960), LISOLECITINAS (G. H. de Haas y L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 315, 1965), PLASMALÓGENOS (P. M. Harris, D. S. Robinson y G. Getz, *Nature*, 188, 742, 1960; O. Renkonen, *Acta Chem. Scand.*, 17, 1925, 1963), ESFINGOMIELINAS (P. D. S. Wood y S. Holton, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 115, 990, 1964), CEREBRÓSIDOS (O. M. Young y J. N. Kanfer, *J. Chromatog.*, 19, 611, 1965), CERAMIDAS (E. Svennerholm y L. Svennerholm, *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 432, 1963), SULFATIDOS (H. Wagner, L. Hörhammer y P. Wolff, *Biochem. Z.*, 334, 175, 1961); métodos basados en la distinta resultante adsorción como consecuencia de las variaciones de polaridad y tamaño molecular de los ácidos grasos.

Los procedimientos cromatográficos con argentación o mercuriación previas permiten la separación de especies moleculares de acuerdo con el grado y el tipo de insaturación (D. de Vries, *Chem. & Ind.*, 1049, 1962; C. B. Barret,

M. S. J. Dallas y F. B. Padley, *Chem. & Ind.*, 1050, 1962) y aplicado sobre todo a LECITINAS (H. P. Kaufmann, H. Wessels y C. Bondopadhyaya, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 65, 543, 1963; M. L. Blank, L. J. Nutter y O. S. Privett, *Lipids*, 1, 132, 1966; L. M. G. van Golde, R. F. A. Zwaal y L. L. M. van Deenen, *Konink. Ned. Akad. Wetenschap. Proc.*, B68, 255, 1965; G. A. E. Arvidson, *J. Lipid Research*, 6, 574, 1965), CEFALINAS (S. M. Hopkins, G. Sheehan y R. L. Lyman, *Biochim. Biophys. Acta*, 164, 272, 1968) y FOSFATIDILGLICEROL (F. Ha-verkate y L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 78, 1965).

Para lograr el fraccionamiento de las especies moleculares, pueden someterse los lípidos a distintos tratamientos químicos, ozonolisis y defosforilación de modo más importante. La ozonolisis reductora de lecitinas conduce a tres nuevos subgrupos (O. S. Privett y M. L. Blank, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 40, 70, 1963; C. F. Wurster y J. H. Copenhaver, *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 351, 1965) en los que las cadenas no saturadas se convierten en aldehidos cuyo grupo formilo corresponde al primer carbono olefínico, pudiendo separarse entre sí y del material de origen.

La conversión de glicerofosfátidos en acetatos de diglicéridos (O. Renkonen, *Acta Chem. Scand.*, 18, 271, 1964; Proc. VI Int. Cong. Biochem., New York, 1964; *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 288, 1966) por hidrólisis con fosfolipasa C de *Bacillus cereus* o *Clostridium welchii* y ulterior acetilación (O. Renkonen, *J. Am. Oil Chemists Soc.*, 42, 298, 1965) facilita el ulterior fraccionamiento, incluso de sus plasmalógenos y alcoxiderivados (O. Renkonen, S. Luisvaara y A. Miettinen, *Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae*, 43, 200, 1965). Esta más fácil separación de las diferentes especies moleculares como derivados de fosfolípidos no polares con relación a las moléculas originales se ha extendido a fosfatidatos de dimetilo (C. F. Wurster y J. H. Copenhaver, *Lipids*, 1, 422, 1966) y diglicéridos libres (L. M. G. van Golde, R. F. A. Zwaal y L. L. M. van Deenen, *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc.*, B68, 255, 1965) y tritilados (E. V. Dyatlovitskaya, V. I. Volkova y L. D. Bergelson, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 946, 1966).

En la actualidad, la separación de especies moleculares de fosfatidos está siendo objeto de la introducción de nuevos tipos de métodos basados en hidrólisis relativas.

La hidrólisis parcial ácida (H. Debuch, *Z. physiol. Chem.*, 304, 109, 1956) y alcalina (D. J. Hanahan y R. Watts, *J. biol. Chem.*, 236, PC59, 1961; O. Renkonen, *Acta. Chem. Scand.*, 16, 1.288, 1962; 17, 275, 1963; 17, 634, 1925, 1963; G. B. Ansell y S. Spanner, *J. Neurochem.*, 10, 941, 1963) suministran productos de más fácil separación que los de partida.

Pero donde alcanzan los métodos de hidrólisis selectiva su mayor versatilidad y significado es en la aplicación de la especificidad de las reacciones enzi-

máticas, que permiten la distinción de diferentes especies de fosfatidilcolinas. La acción de fosfolipasa A de *Crotalus adamanteus* sobre lecitinas (J. H. Moore y D. L. Williams, *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 41, 1964; L. J. Nutter y D. S. Privett, *Lipids*, 1, 258, 1966; O. Renkonen, *Lipids*, 3, 191, 1968) da lugar a lisolecitinas, ácidos grasos libres y una fracción de lecitina inalterada, cuya composición se determina a diferentes grados de hidrólisis. Ello ha conducido a definir un orden de hidrólisis que va desde la máxima facilidad de ataque en lecitinas  $\alpha$ -no saturadas  $\beta$ -saturadas hasta la exhibición de la mayor resistencia por parte de las lecitinas  $\alpha,\beta$ -saturadas. La fosfolipasa C de *Clostridium welchii* (E. Graf y Y. Stein, *Biochim. Biophys. Acta*, 116, 166, 1966) escinde las lecitinas a una velocidad de hidrólisis que aumenta con la saturación del ácido graso de la  $\beta$ -posición, hecho basado en la diferente estructura de agregación que se logra en función de la concentración de las especies moleculares individuales.

Haciendo uso de la especificidad de la fosfolipasa A de venenos de serpiente, se han determinado las distribuciones posicionales de los ácidos grasos de toda una serie de fosfolípidos de *Mycobacteria* (H. Okuyama, T. Kankura y S. Nojima, *J. Biochem.*, 61, 732, 1967).

La estructura molecular de los triglicéridos, es decir, su análisis estereoespecífico, con la determinación de la composición de ácidos grasos en las posiciones 1, 2 y 3, puede resolverse por diversos procedimientos. La degradación de los triglicéridos por medio de lipasa pancreática conduce a un  $\alpha,\beta$ -diglicérido racémico que se convierte en un fosfo-derivado, con posterioridad resuelto por fosfolipasa A (H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, 6, 10, 1965). La fosforilación de la mezcla de 1,2- y 2,3- diglicéridos puede realizarse por ATP en presencia de la diglicérido-quinasa de *E. Coli*, que suministra un ácido fosfatídico tan sólo a partir del 1,2-diglicérido; este ácido fosfatídico contiene los ácidos grasos originales de las posiciones 1 y 2 de los triglicéridos. Si la acción de la lipasa pancreática continúa sobre los 1,2- y 2,3- diglicéridos, se obtiene el 2-monoglicérido; la diferencia entre la composición en ácidos grasos del ácido fosfatídico y la del monoglicérido hace referencia a la composición de la posición 1 (P. M. Slakey y W. E. M. Lands, *Lipids*, 3, 30, 1968).

La especial naturaleza de los ácidos grasos de los triglicéridos de ciertos orígenes fuertemente no saturados impide la acción de la lipasa pancreática. De otro lado, los métodos anteriores no determinan directamente los ácidos grasos de la posición 3. El primer problema se ha resuelto mediante la preparación de los  $\alpha,\beta$ -diglicéridos por métodos químicos (M. Yurkowski y H. Brockerhoff, *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 55, 1966). La determinación directa de la posición 3 hace uso de la hidrólisis del ácido graso de la posición 1 de un L-2-fosfatídico por fosfolipasa A (G. H. de Haas y L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys.*

*Acta*, 84, 469, 1964); el L-2-fosfatídico resulta, a su vez, del triglicérido vía 1,3-diglicérido (H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, 8, 167, 1967).

La separación previa de las especies moleculares permite conocer la distribución de sus ácidos grasos en cada una de las posiciones.

La distribución posicional de los ácidos grasos en los triglicéridos expresa una indudable tendencia al establecimiento de esquemas determinados, cuyo principio regulador no pasa aún de la mera especulación (H. Brockerhoff, *Comp. Biochem. Physiol.*, 19, 1, 1966).

Parece ser que la esterificación de los ácidos grasos en cada posición procede con una especificidad que no se correlaciona con la composición de otras posiciones de la molécula.

La abundancia relativa de las diferentes especies de triglicéridos del hígado está relacionada, en parte, con la composición de los 1,2-diglicéridos constituyentes de las lecitinas del mismo tejido.

Casi todos los triglicéridos animales se ajustan a reglas generales, correspondiendo al mismo proceso de biosíntesis vía ácido fosfatídico, habiéndose establecido generalizaciones para mamíferos, peces, aves, invertebrados, anfibios y reptiles (H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, P. C. Hwang y C. Litchfield, *Lipids*, 3, 24, 1968).

En los triglicéridos de depósito de ratas, los ácidos monoenoicos 20:1 y 22:1 se acumulan en las posiciones 1 y 3, y los ácidos polienoicos en la posición 3 en un esquema similar al de los mamíferos marinos.

Es un hecho notable la averiguación de que todos los isómeros de un grupo de ácidos presentan diferentes esquemas de distribución; los isómeros no saturados en 9 se acumulan, en general, en la posición 2. En los triglicéridos, el origen del ácido parece gobernar la dirección de su inserción en la molécula y así los ácidos exógenos se incorporan en las posiciones 1 y 3 (H. Brockerhoff y R. G. Ackman, *J. Lipid Res.*, 8, 661, 1967).

Los ácidos grasos saturados y los ácidos polienoicos manifiestan una gran regularidad en su distribución en los triglicéridos; en cambio, los monoenoicos en 9(16:1), 9(18:1) y 11(18:1) muestran una gran variabilidad en su distribución que se ha relacionado con la función de la deshidrogenación en 9,10 en el mantenimiento de las características físicas de la molécula. Ante la abundante presencia de ácidos polienoicos se puede inhibir esta reacción de deshidrogenación (R. R. Brenner y R. O. Peluffo, *J. Biol. Chem.*, 241, 5213, 1966) e impedir la presencia de los ácidos mono no-saturados en la molécula.

La determinación de la distribución posicional en los glicerofosfolípidos de cerebro (H. Yabuuchi y J. S. O'Brien, *J. Lipid Res.*, 9, 65, 1968) y, en particular, de las membranas mitocondriales, tiene una especial importancia en el estudio de las interacciones lípido-proteína en las lipoproteínas de biomembranas.

Importantes diferencias cuali y cuantitativas se han observado en lecitinas de distintos órganos de mamíferos.

*El impacto más inmediato de las anteriores concepciones y de sus tratamientos en el orden biológico viene siendo la investigación de su presencia y evolución en los organismos vivos y la correlación de las informaciones obtenidas.*

La amplia y extensa distribución de aminoácidos, azúcares y bases nitrogenadas no sirve para establecer relaciones filogenéticas entre las especies. No sucede lo mismo con los lípidos y sobre todo con ciertos ácidos grasos no saturados, poli-no saturados de modo más importante, que sirven poderosamente para establecer relaciones filogenéticas. La capacidad de síntesis de ácidos grasos, el conocimiento de las etapas de biosíntesis con la utilización de ácidos grasos exógenos isotópicamente marcados, puede servir de base al establecimiento de relaciones entre las especies al poderse detectar la aparición en la escala evolutiva del momento en que comenzó a ser posible la biosíntesis "de novo" en la célula. En este sentido, determinadas características metabólicas específicas sirven para caracterizar clases o especies. Así, en los rumiantes los ácidos grasos no saturados de la dieta resultan hidrogenados parcialmente, dando lugar a isómeros posicionales "trans" que no existen en la naturaleza en otras localizaciones.

Al comparar las estructuras de los ácidos grasos en los organismos vivos se observa como hecho general una *simplificación en la composición de ácidos grasos al pasar de las más sencillas a las más organizadas formas de vida*, con arreglo, pues, a un cierto desarrollo evolutivo (T. P. Hilditch y J. A. Lovern, *Nature*, 137, 478, 1936).

Dentro del mismo organismo y aun dentro del mismo tejido se encuentran amplias diferencias en la composición de ácidos grasos de diferentes tipos de lípidos. Así, mientras los triglicéridos presentan una especificidad de especie —iguales los ácidos grasos de los distintos órganos de la misma especie—, los fosfolípidos exhiben una especificidad de órgano —iguales los ácidos grasos de los mismos órganos de distintas especies—.

Los fosfolípidos contienen por lo general mayor porcentaje de ácidos grasos superiores que los que poseen los glicéridos. Las ceras vegetales poseen los mayores saturados en tanto que glicéridos y fosfolípidos son, por lo general, ricos en oléico y linoléico.

Además, la existencia de un proceso fisiológico determinado puede requerir de modo imprescindible la necesaria presencia de un cierto ácido graso —ácido linoléico, por ejemplo, para los procesos fotosintéticos—, sin que ello forzosamente implique la obligatoriedad del proceso ante la presencia del ácido graso.

Del conjunto de ácidos grasos, son los poli-no saturados uno de los tipos capaces de establecer criterios de diferenciación más notables.

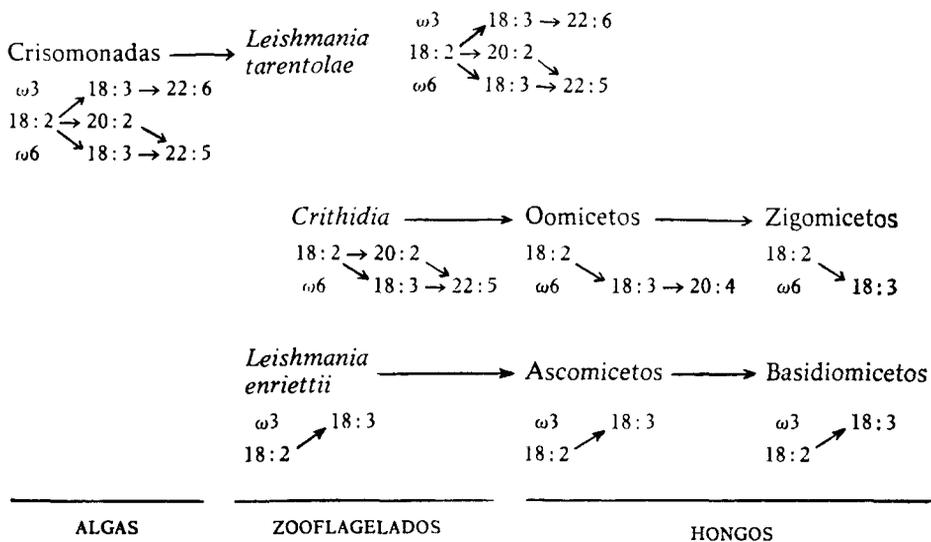
En general, los LÍPIDOS DE LAS BACTERIAS se caracterizan por la existencia de ácidos grasos que no se encuentran en algas, hongos y protozoos. Las bacterias, incluidas las bacterias fotosintéticas, no son capaces de biosintetizar ácidos grasos poli-no saturados; no obstante, se han descrito muy escasas excepciones a esta norma general ante la presencia de ácido linoléico en *Rhodospseudomonas particilis* (A. R. Hands y W. Bartley, *Biochem. J.*, 84, 238, 1962) y un C 20:4 en *Sarcina lutea* (C. K. Huston y P. W. Albro, *J. Bacteriol.*, 88, 425, 1964).

Mayores discrepancias se presentan en las algas verde-azules, sobre todo en lo que se refiere a la presencia de ácido linolénico y a sus actividades fotosintéticas. La presencia de este ácido se atribuyó en principio a la existencia de membranas de cloroplastos; sin embargo, ha podido comprobarse que, aun en ausencia de cloroplastos, el ácido linolénico puede estar presente (R. W. Holton, H. H. Blecker y M. Onore, *Phytochem.*, 3, 595, 1964) o no (E. Levin, W. J. Lennarz y K. Bloch, *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 471, 1964). *Anacystis nidulans*, un alga unicelular, sintetiza ácido linoléico, pero no otros ácidos poli-no saturados. Algas filamentosas verde-azules superiores sintetizan ácidos poli-enoicos y del tipo  $\omega_3$ , pero no del  $\omega_6$ , los cuales están presentes en las algas rojas y persisten en las verdes y pardas (E. Klenk y H. Pfluger, *Z. physiol. Chem.*, 335, 53, 1963).

En ALGAS SUPERIORES, HONGOS Y PROTOZOOS se ha detectado toda una serie de poli-no saturados esterificados, abundando sobre todo en los lípidos polares, de igual manera que ocurre en los mamíferos, si bien sean poseedores de funciones específicas poco definidas.

Los hongos son poseedores de una mayor variedad, con predominio de C 18:2, frente a la mezcla más rica de poli-no saturados presentes en las algas y una posición intermedia en los protozoos. En los distintos órdenes de protozoos se presentan ciertas diferencias; ciliados y flagelados carecen o son escasos en ácidos grasos de 20C, en tanto que las amebas no poseen poli-no saturados de 18C. Es manifiesto, pues, cómo al aumentar la especialización en el modo de vida se restringen las posibilidades de biosíntesis de ácidos grasos.

El análisis detallado de estos ácidos ha permitido establecer relaciones filogenéticas (E. D. Korn, C. L. Greenblatt y A. M. Lees, *J. Lipid Res.*, 6, 43, 1965. R. Shaw, *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 230, 1965; *Comp. Biochem. Physiol.*, 18, 325, 1966. R. Shaw, "Polyunsaturated Fatty Acids of Microorganisms", en *Adv. Lipid Res.*, 4, 107, 1966) como las que figuran a continuación con expresión de algunas conexiones entre ácidos poli-enoicos.



Todos estos ácidos múltiplemente no saturados son de 16, 18 y 20 átomos de carbono con 2-6 dobles enlaces localizados en distintas posiciones de la cadena y cuyas especiales estructuras químicas son responsables de funciones concretas. La atribución al ácido  $\alpha$ -linolénico y otros poli-no saturados de una función general en el desprendimiento de oxígeno (J. Erwin y K. Bloch, *Science*, 143, 1006, 1964) ha quedado en entredicho al observarse que ciertas algas con aparato fotosintético no poseen ni son capaces de biosintetizar  $\alpha$ -linolénico ni otros poli-no saturados (R. W. Holton, H. H. Blecker y M. Onore, *Phytochem.*, 3, 595, 1964). Las excepciones son, sin embargo, escasas y se encuadran en los órdenes más primitivos capaces de llevar a cabo el proceso fotosintético en ausencia del ácido  $\alpha$ -linolénico, esencial, por otro lado, en algas superiores y plantas. El ácido  $\gamma$ -linolénico participa —de igual manera que en los organismos animales— en el metabolismo energético dependiente de la fosforilación oxidativa (D. Hulanicka, J. Erwin y K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, 239, 2778, 1964) y se concentra de modo singular en los fosfolípidos. En algunos hongos, el ácido  $\alpha$ -linolénico juega un papel especial en el mecanismo de reproducción (R. Shaw, *Nature*, 213, 86, 1967). Otras funciones de los protistas en que está implicada la participación de los ácidos grasos múltiplemente no saturados del tipo  $\omega 6$  es el control de la permeabilidad de las membranas y la oxidación del colesterol.

De todas maneras, en *el establecimiento de relaciones entre la existencia de estructuras definidas de ácidos grasos y sus especies de origen, es forzoso eliminar la influencia ambiental*; en caso contrario, la posibilidad existe de variaciones considerables aun entre individuos de las mismas especies. Así, las condiciones de cultivo de microorganismos, pH, oxigenación y composición del medio, afectan la composición y el rendimiento de los lípidos (V. A. Knivett y J. Cullen, *Biochem. J.*, 94, 36P, 1965. J. H. Law, H. Zalkin y T. Kaneshiro, *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 143, 1963). En ciertos casos, el estado de crecimiento del organismo es un factor esencial en la distribución de los ácidos grasos. En mutantes de *E. coli* auxótrofos de lisina se ha observado (A. M. Municio y E. M. Eckardt, *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 207, 1967) que los cultivos jóvenes poseen elevadas proporciones de ácidos monoenoicos, 16:1 y 18:1, y muy bajos valores de los correspondientes ácidos ciclopropánicos de 17 y 19 átomos de carbono, convirtiéndose los primeros en los segundos durante una primera fase de crecimiento logarítmico (A. M. Municio, T. Díaz y A. Martínez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11, 195, 1963); durante la ulterior fase de lisis celular, los ácidos ciclopropánicos alcanzan un máximo para volver de nuevo a descender, en oposición a lo que ocurre con los no saturados.

Al lado de los lípidos que radican en el interior de las células, ha recibido atención en los últimos años el estudio de los *lípidos extracelulares* que levaduras y bacterias (F. H. Stodola, M. H. Deinema y J. F. T. Spencer, *Bact. Rev.*, 31, 194, 1967. P. Castellón, T. Díaz, A. Martínez y A. M. Municio, *Anal. Quím.*, 59, 231, 1963. D. G. Bishop y E. Work, *Biochem. J.*, 96, 567, 1965) se vierten en los medios de cultivo. Aunque de naturaleza compleja en ambos casos, sus constituyentes son distintos y en las bacterias estudiadas (A. M. Municio y E. M. Eckardt, *Anal. Quím.*, 61, 1233, 1965) los lípidos se insertan en lipopolisacárido-proteínas, cuyas características químicas e inmunológicas permiten relacionarlas con la pared bacteriana (A. M. Municio, T. Díaz y A. Martínez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11, 195, 1963). En este sentido hay que destacar que incluso los ácidos grasos de estos lípidos complejos extracelulares varían con el estado metabólico del organismo y las relaciones ácidos monoenoicos-ácidos ciclopropánicos son similares a las observadas en los lípidos intracelulares. Más aún, la penicilina, que influencia el ciclo lipídico en la síntesis de la pared bacteriana, modifica los niveles lipídicos extracelulares (P. Castellón, T. Díaz, E. M. Eckardt y A. M. Municio, *Anal. Quím.*, 62, 747, 1966) y altera incluso las relaciones biosintéticas entre los ácidos ciclopropánicos y sus precursores monoenoicos (A. M. Municio y E. M. Eckardt, *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 207, 1967).

Todas estas influencias de las condiciones metabólicas de los microorganismos sobre la presencia de ácidos grasos obliga a guardar especiales precau-

ciones en los criterios que definen relaciones filogenéticas y para lograr conexiones entre la estructura química y las funciones que desempeñan los ácidos grasos. Y, además, nunca será la mera presencia o ausencia de un ácido graso dato definitivo para establecer dichas relaciones; el mecanismo de biosíntesis será siempre la comprobación inequívoca de estas relaciones.

Por lo que a las CLASES DE LÍPIDOS se refiere, en los protozoos de rumen de cordero se ha aislado por vez primera un tipo muy singular desde el punto de vista químico: los *fosfolípidos* (M. Horiguchi y M. Kandatsu, *Nature*, 184, 901, 1959), que con posterioridad se han identificado en anémonas marinas *Anthopleura elegantissima* (J. S. Kittridge, E. Roberts y D. G. Simonsen, *Biochemistry*, 1, 624, 1962) y *Metridium dianthus* (L. D. Quin, *Science*, 144, 1133, 1964), así como en larva de *Musca domestica* (R. G. Bridges, *Nature*, 211, 199, 1966). La presencia de 2-aminoetil-fosfato y 2-aminoetil-fosfonato de ceramida ha sido recientemente investigada (T. Hori, O. Itasaka e I. Arakawa, *Abst. VII Int. Cong. Biochem.*, 834, 1967) en toda una serie de animales acuáticos respondiendo todas las especies a la misma distribución de ambos compuestos.

En la *vida acuática* no existe una distinción aguda entre las grasas de plantas y animales, con pequeñas diferencias en la composición de ácidos grasos entre especies marinas y de agua dulce. El carácter distintivo de las grasas de especies acuáticas es la presencia de pequeños niveles (15-20 por ciento) de ácidos grasos saturados y una gran y amplia participación de ácidos grasos no saturados. El ácido estearidónico (octadeca-6,9,12,16-tetranoico) no se encuentra en los lípidos de plantas y animales terrestres.

En los *invertebrados acuáticos*, los crustáceos que se alimentan del fitoplankton marino exhiben un tipo de grasas que encaja en el conjunto de grasas marinas. En los *elasmobranquios*, los aceites de hígado responden a varios grupos que van desde la existencia de elevadas proporciones —hasta 40 a 50 por ciento— de ácidos grasos saturados hasta la de grandes proporciones de altamente no saturados, pasando por la abundancia de monoenoicos. La composición de ácidos grasos del aceite de hígado no viene determinada tan sólo por su origen biológico, ya que se han observado destacadas diferencias entre las mismas especies de aguas diferentes. En los *teleósteos* existen variaciones en la composición de ácidos grasos en dependencia del lugar de su almacenamiento. Un caso singular lo constituye el aceite de *Ruvettus pretiosus*, que está constituido por alcoholes cetílico, oleílico y octadecílico combinados con ácidos oléico y dihidroxiléico (W. M. Cox y E. E. Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, 54, 220, 1932).

En los *animales terrestres*, los datos hasta ahora existentes demuestran que poseen grasas de depósito distintas de las de animales acuáticos en su falta relativa de C-20 y C-22 altamente no saturados. Las grasas de depósito de

*anfibios* y *reptiles* son intermedias entre las de animales terrestres más evolucionados y las de animales acuáticos. Diferencias en las que falta por definir la contribución de los factores dietéticos.

Dentro del ímpetu y la expansión de la Biología de los lípidos en los últimos años y conservando sus mismas características esenciales, su función reúne aspectos distintivos en los *insectos*. Su consideración como sustratos de la embriogénesis y la metamorfosis va a ofrecer posibilidades difícilmente igualables para un mejor análisis bioquímico del desarrollo y de la diferenciación moleculares; la amplitud enorme de esta clase en el reino animal y la gran variedad de sus circunstancias ecológicas y etológicas, al no permitir fáciles generalizaciones, imponen extensas investigaciones en este campo. Estas peculiaridades y la adicional incidencia de funciones fisiológicas específicas en el metabolismo lipídico introducen nuevos factores en la contemplación de la Bioquímica de insectos.

Los ácidos grasos no son, en general, factores nutritivos esenciales en los insectos, si bien son necesarios para su aclimatación a temperaturas superiores a la normal y como fuentes energéticas. A pesar de lo cual, un cierto número de especies exhiben requerimientos dietéticos en ácidos grasos. Los niveles totales de lípidos varían, entre los descritos, de 0,94 por ciento en *Lycophatia margaritosa* a 28 por ciento en *Belonius elphos* y la composición en ácidos grasos exhibe con frecuencia una distribución semejante a la exhibida por la dieta correspondiente; así, los ácidos grasos de adultos de *Tanytarsus lewisi* contienen ácidos polienoicos similares a los contenidos en la dieta de sus larvas; hecho que, sin embargo, no puede generalizarse y obliga a considerar la existencia de cambios metabólicos en los lípidos de la dieta y la síntesis "de novo" de otros constituyentes.

Unas cuarenta especies de insectos entre Coleópteros, Neurópteros, Tricópteros, Homópteros, Dípteros, Lepidópteros, Himenópteros y Ortópteros, se han examinado en la distribución de sus ácidos grasos (J. S. Barlow. *Can. J. Biochem.*, 42, 1365, 1964) y ha conducido a la inicial conclusión de que esta composición es una característica de especie. En esta composición, los hechos más sobresalientes son en Dípteros la elevada proporción —20 a 60 por ciento— de ácido palmitoléico y en Afidoideos la de mirístico —más del 80 por ciento—.

*Encuadrados en el seno de los Dípteros y familia Tripétidos, los géneros Dacus y Ceratitis son en España de considerable importancia económica por los especiales hábitos de sus larvas; este hecho, el fundamento fisiológico de su control y la obtención de datos acerca de la Bioquímica del desarrollo y la metamorfosis, nos ha llevado en los últimos años a realizar un estudio sobre la regulación del metabolismo de lípidos y aminoácidos durante el ciclo biológico de Dacus oleae y Ceratitis capitata.*

La mayor parte de los datos previos sobre la composición en ácidos grasos de Dípteros ha sido realizada en el estado de pupa y a continuación se pueden observar las diferencias que en el mismo estado presentan las especies mencionadas (C. Barroso, A. M. Municio y A. Ribera, *Comp. Biochem. Physiol.*, 28, 239, 1969).

Acido graso	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
<i>C. capitata</i> (pupa) ...	37.1	30.6	3.2	21.5	1.7
<i>D. oleae</i> (id.) .....	16.9	8.1	2.2	60.0	7.6
Dípteros (id.). Datos de la literatura ...	15-28	19-60	0-6	18-35	0-25

Datos que presentan como más importante característica diferencial elevados niveles de ácido palmítico en *C. capitata* y de ácido oléico en *D. oleae*; elevada proporción esta última que es claramente contrarrestada por los bajos niveles de los ácidos de 16 átomos de carbono y que, como se ve, no coincide con los datos generalmente descritos para otros Dípteros. Esta variación en la distribución cuantitativa en *D. oleae* de los ácidos palmítico, palmitoléico y oléico es muy posible que, al menos en gran medida, tenga como fundamento la particular naturaleza del medio en que tiene lugar la ontogénesis larvaria.

La extensión de los datos anteriores a la distribución de ácidos grasos durante los tres estados de la metamorfosis de ambas especies ha dado lugar a los resultados de la tabla que figura a continuación.

Acidos grasos	D. Oleae			C. Capitata		
	Adulto	Pupa	Larva	Adulto	Pupa	Larva
10	1.0	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2
11	1.2	0.1	0.6			
12	2.6	0.6	1.1	1.7	1.4	1.4
12.6	0.4	0.4	0.5			
13	0.1	0.1	0.6			
14	1.7	0.9	1.3	3.7	3.3	3.6
14.6	0.5	0.6	0.8	0.7	0.4	0.7
15	0.1	0.1	0.1			
16	23.8	16.9	19.1	27.5	37.1	37.0
16:1	21.6	8.1	9.3	38.0	30.6	30.1
17	0.3	0.5	0.4			
17.6	0.1	0.2	0.1			
18	2.0	2.2	2.2	2.2	3.2	2.9
18:1	31.3	60.0	53.8	21.5	21.5	20.3
18:2	10.7	7.6	8.8	3.7	1.7	3.0
18:3	2.4	1.4	0.9	0.4	0.1	0.6

En esta tabla puede observarse cómo las variaciones no son significativas en la transición larva-pupa y sí se presentan en la siguiente pupa-adulto de ambas especies; entre ellas es destacada la utilización del ácido oléico por el adulto de *D. oleae*, la biohidrogenación del cual y su degradación pueden explicar las variaciones exhibidas durante el desarrollo de esta especie.

Estos estudios sobre la distribución de ácidos grasos han sido profundizados en varias direcciones que incluyen su participación independiente en los conjuntos de lípidos neutros y polares, así como en sus clases integrantes, y su evolución con la edad de los diferentes estadios. La metamorfosis se ha estudiado también desde el punto de vista de la biosíntesis comparada de los ácidos grasos en cada estadio y de las diferentes clases de lípidos, así como de la incorporación comparada de fosfato-<sup>32</sup>P en las distintas clases de fosfolípidos.

*En este orden de ideas vamos a resaltar ciertos aspectos de interés en el conjunto de resultados inéditos encuadrados en una investigación sistemática sobre Bioquímica del desarrollo.*

La evolución de los ácidos grasos totales en la ontogénesis larvaria de *Ceratitis capitata* exhibe los resultados siguientes (col. F. Díaz de Espada, A. Ribera):

A. grasos	1.ª edad	2.ª edad	3.ª edad
12:0	tr.	1.2	1.4
14:0	2.1	3.3	3.7
16:0	21.7	41.6	39.2
16:1	34.2	19.7	26.3
18:0	5.9	6.8	3.6
18:1	33.9	18.7	19.8
18:2	2.2	8.6	5.8

De los esquemas de distribución de ácidos grasos en los tres estados de desarrollo larvario puede concluirse: 1) el estado larvario ejerce un efecto importante sobre la composición de ácidos grasos, manifestando una mayor actividad metabólica durante la transición del primer al segundo estado de desarrollo; 2) los ácidos palmítico, palmitoléico y oléico son responsables del 80-90 por ciento del total de ácidos grasos y en ellos radican los más importantes cambios que tienen lugar en la distribución de ácidos grasos; 3) el cambio en la distribución resulta de modo principal de una clara disminución en el porcentaje de los ácidos palmitoléico y oléico del primer al segundo estado larvario; 4) la relación ácidos grasos saturados/no saturados exhibe un incremento de 0.4 en el primer estado a 1.1 en el segundo y 0.9 en el tercero; 5) la disminución que experimentan los ácidos palmitoléico y oléico en la transición del primer al segundo estado de desarrollo viene contrarrestada por el incremento de ácido pal-

mítico; 6) las variaciones en la distribución de los ácidos grasos que ocurren durante la transición del segundo al tercer estado de desarrollo no son significativas desde un punto de vista cuantitativo, observándose, sin embargo, una clara tendencia a la desaturación.

Los lípidos totales del tercer estado de desarrollo larvario de *C. capitata* se distribuyen en un 65 por ciento de lípidos neutros y un 35 por ciento de lípidos polares. La distribución de ácidos grasos en ambos tipos de lípidos es la siguiente (col. C. Barroso, A. Ribera):

Lípidos	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Neutros .....	1.8	4.1	44.3	19.8	6.5	22.3	1.2	tr.
Polares .....	0.9	5.5	26.7	20.4	5.8	28.5	9.9	2.1

en donde puede observarse una neta diferencia con predominio de la no saturación en los lípidos polares.

Un ejemplo de la ulterior experimentación con ambos tipos de lípidos nos lo va a dar la distribución de los ácidos grasos integrantes de las fracciones de triglicéridos, ácidos grasos libres y diglicéridos (col. J. Ortín, A. Ribera).

A. grasos	Diglicéridos	Acidos grasos libres	Triglicéridos
12:0	1.0	1.0	1.8
14:0	3.6	4.6	4.3
16:0	65.2	35.2	43.9
16:1	10.4	34.1	26.9
18:0	3.8	2.4	4.1
18:1	7.9	22.0	19.0
18:2	9.1	1.7	1.0
18:3	tr.	—	—

Los triglicéridos son la clase más importante desde un punto de vista cuantitativo (70 por ciento) y le siguen los ácidos grasos libres con cantidades del 28-30 por ciento, y el resto, diglicéridos.

Aunque de una manera indirecta, los datos de la tabla anterior reflejan un esquema de biosíntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos y diglicéridos como intermediarios. Además, las diferencias que presentan los esquemas de distribución de los ácidos grasos libres y los de los triglicéridos están de acuerdo con una formación "de novo" de los ácidos grasos y con el hecho de la ausencia de lipasas extradigestivas en los distintos estados del desarrollo de *Ceratitis capitata* (col. E. Catalán, S. Vega).

Con el mismo criterio se ha profundizado en el conocimiento de los lípidos polares y figuran a continuación los porcentajes de ácidos grasos encontrados

en la fosfatidiletanolamina de insectos adultos de *Ceratitis capitata* en comparación con los de *M. doméstica* e incluso las distribuciones posicionales de los ácidos grasos (col. J. M. Fernández Sousa, A. Ribera).

A. grasos	C. capitata totales	M. doméstica		
		Totales	Pos. 1	Pos. 2
14:0	1.2	1.9	1.7	2.1
16:0	19.1	22.9	32.6	13.2
16:1	8.9	30.3	15.3	45.3
18:0	6.0	3.6	3.6	3.6
18:1	31.7	24.4	24.4	24.4
18:2	21.1	13.0	22.2	3.8
18:3	12.0	3.5	—	7.0

Además de esta evolución molecular de los ácidos grasos en el desarrollo, se ha seguido éste mediante las variaciones de los más importantes lípidos polares, esfingomielinas, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y cardiolípinas (col. M. P. Castellón, A. Suárez).

Desde un punto de vista cuantitativo, el contenido en fosfolípidos experimenta una variación neta en el sentido de un incremento notable al pasar de los estados de larva (6.5 por ciento del total de lípidos) y pupa (3.8 por ciento) al de adulto (20 por ciento); valores respectivamente que, referidos a peso seco de insecto seco, son 1.4, 0.8 y 2.4 por ciento.

La variación cuantitativa de los fosfolípidos más importantes figura a continuación, expresada en porcentajes de fósforo:

Fosfolípido	Larva	Pupa	Adulto
Esfingomielina .....	5.6	9.0	1.0
Fosfatidilcolina .....	16.4	17.0	13.3
Fosfatidiletanolamina ....	38.3	37.0	72.8
Fosfatidilserina .....	5.5	13.0	6.1
Cardiolípina .....	1.2	4.6	2.2

El contenido total de cefalinas puede observarse cómo aumenta de modo notable en el adulto, paralelamente al contenido total de fosfolípidos, ante la exigencia de una mayor vida de relación y un complejo sistema nervioso. El incremento particular que experimenta la fosfatidilserina en la transición larva → pupa permite suponer su participación en la biosíntesis y ulterior acumulación de fosfatidiletanolamina por un mecanismo de descarboxilación. Sin clara interpretación, la mayor presencia de cardiolípinas en el estado de pupa cabe pensar en su coincidencia con una fuerte actividad circulatoria hormonal y enzimática durante la ecdisis.

Todo ello no son sino ejemplos de una profunda complejidad estructural en los lípidos, la variación estructural de sus ácidos grasos constituyentes y de una diversidad molecular resultante, cuya presencia en los seres vivos sirve de base, pues, a la interpretación molecular de la especiación y de fenómenos vitales trascendentes.

Estos lípidos del organismo, en su biosíntesis, su degradación y sus niveles, tienen que ajustarse a estas condiciones óptimas propias del estado evolutivo de cada organismo por medio de adecuados sistemas de control.

En realidad, ya Lavoisier había dejado constancia de la necesidad de un cierto control cuando decía: "No se puede dejar de admirar el sistema de libertad general que la naturaleza ha querido establecer en todo lo concerniente a los seres vivos. Al darles la vida, el movimiento espontáneo, una fuerza activa, las necesidades, las pasiones..., no ha prohibido su uso en absoluto; ella ha querido que fuesen libres incluso para abusar, pero prudente y sabia ha establecido reguladores por doquier; al lado del goce ha hecho marchar la saciedad... Tanto el orden moral que el orden físico tienen sus regulaciones, ya que de otro modo, hace tiempo que las sociedades humanas habrían dejado de existir, o más bien no hubieran jamás existido."

Casi dos siglos después de estos principios de Lavoisier se ha podido profundizar en el detalle de estas regulaciones; se sabe que una célula no sintetiza sin importarle qué, ni sin importarle cuándo y ni sin importarle qué cantidad, sino que, al contrario, es capaz de administrarse ella misma sin carencia y sin exceso, de modo que la producción de los productos necesarios se adapte constantemente al consumo.

Se llega de modo tan lógico como insensible desde el nivel de organismos al celular, cuya regulación se considera hoy en el sentido de la síntesis y actividad de macromoléculas, ya que la misma influencia hormonal comienza a interpretarse en virtud de su actividad sobre el genoma.

*Bajo este aspecto, la ya insistida diversidad y complicación estructurales de los lípidos, el gran número de factores enzimáticos y hormonales que regulan sus niveles tisulares y plasmáticos y la importancia de sus alteraciones, hace del metabolismo lipídico y de su control uno de los más intrincados y de mayor proyección fisiopatológica.*

Los triglicéridos de la dieta como consecuencia de la acción intraluminal de la lipasa pancreática y las sales biliares originan, de modo predominante, monoglicéridos y ácidos grasos libres, los cuales, en forma micelar —con la participación de las sales biliares— (A. E. Hofmann y B. Borgström, *Fed. Proc.*, 21, 43, 1962), llegan a las células de la mucosa intestinal en las que son descargados en forma molecular. Los monoglicéridos y ácidos grasos entran en las células de la mucosa (E. Strauss, *J. Lipid Res.*, 7, 307, 1966), donde actúa

el complejo glicérido-sintetasa localizado en el retículo endoplásmico (G. A. Rao y J. M. Johnston, *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 465, 1966), que origina de nuevo los triglicéridos. Estos triglicéridos, nuevamente formados, dan lugar a quilomicrones que, habiendo abandonado la célula, aparecen en los lacteales; quilomicrones que están constituidos por un núcleo central triglicérido rodeado por lipoproteína, colesterol y fosfolípido, con arreglo a un mecanismo aún por aclarar.

Los triglicéridos constituyentes de los quilomicrones se captan de modo especial por el TEJIDO ADIPOSO; en el HÍGADO radica la formación endógena de lipoproteínas utilizando como posibilidades alternativas sin confirmar, bien de modo directo los quilomicrones o los ácidos grasos libres del PLASMA para su reincorporación a nuevos triglicéridos.

*TEJIDO ADIPOSO e HÍGADO ocupan, pues, una posición central en el metabolismo lipídico, concierne tanto a los procesos de síntesis como de degradación; tejidos ambos que captan del PLASMA los materiales necesarios para su propia y característica lipogénesis y que vierten al PLASMA los productos resultantes bien de esta biosíntesis, bien de una acción lipolítica sobre los mismos. El plasma, pues, va a poner en comunicación intestino, tejido adiposo, hígado y otros tejidos —músculo, por ejemplo— a través de distintas formas de transporte: QUILOMICRONES, LIPOPROTEÍNAS y ÁCIDOS GRASOS LIBRES.*

<i>Localización de origen</i>	<i>Forma de transporte en plasma</i>	<i>Destino</i>
Intestino (lípidos de la dieta) ...	Qilomicrones .....	Hígado y tejido adiposo
Hígado e intestino .....	Lipoproteínas .....	{Tejidos periféricos /Tejido adiposo
Tejido adiposo .....	Acidos grasos libres.	{Hígado /Tejidos periféricos /Tejido adiposo

Puede observarse en el cuadro anterior la íntima conexión que a través del plasma se establece entre hígado y tejido adiposo, lo cual es motivo no sólo de la competencia por los quilomicrones de la dieta, sino de su participación relativa en la actividad lipogénica a partir de los hidratos de carbono. En este sentido la experimentación no es concluyente. Al lado de aseveraciones sobre la más importante participación hepática en la síntesis "de novo" de los lípidos (G. R. Jansen, C. F. Hutchison y M. E. Zanetti, *Biochem. J.*, 99, 323, 1966; J. K. Patkin y E. J. Masoro, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 42, 101, 1964), la intervención fundamental del tejido adiposo tiene asimismo su comprobación

experimental (G. R. Jansen, M. E. Zanetti y C. F. Hutchison, *Biochem. J.*, 102, 864, 1967). Diferencias dietéticas y de especie parecen ser las causantes de estas divergencias (A. G. Goodridge, *Comp. Biochem. Physiol.*, 13, 1, 1964; J. Hirsch, en "Handbook of Physiology", Ed. por A. E. Renold y G. F. Cahill, *American Physiological Society*, pág. 181, 1965), basadas en la distinta actividad metabólica de tejido adiposo e hígado en las diferentes especies (A. G. Goodridge y E. G. Ball, *Comp. Biochem. Physiol.*, 16, 367, 1965; *Amer. J. Physiol.*, 211, 803, 1966; E. M. Wise y E. G. Ball, *Proc. nat. Acad. Sci. Wash.*, 52, 1.255, 1964).

La función primaria del TEJIDO ADIPOSO es la de almacenar grasa en los estados de suficiencia metabólica y la de cederla de manera controlada en los momentos de necesidades energéticas.

El TEJIDO ADIPOSO capta quilomicrones y lipoproteínas circulantes (L. Markscheid y E. Shafir, *J. Lipid Res.*, 6, 247, 1965); B. Shapiro, en "Handbook of Physiology", Ed. por A. E. Renol y G. F. Cahill, *American Physiological Society*, página 217, 1965) y en cuya incorporación y degradación juegan un papel fundamental diferentes lipasas.

Si las velocidades de síntesis y degradación de triglicéridos son iguales, los depósitos grasos se mantendrán a nivel constante. Una movilización neta ocurrirá si el equilibrio se altera por un aumento desproporcionado de la velocidad de degradación o disminución de la velocidad de síntesis. A la inversa, tendrá lugar una deposición neta de triglicéridos si la velocidad de síntesis se incrementa o la velocidad de degradación disminuye.

La CAPTURA DE LIPOPROTEÍNAS por el tejido adiposo viene fundamentada en la acción de una lipoproteína-lipasa (M. R. Salaman y D. S. Robinson, *Biochem. J.*, 99, 640, 1966; B. Persson, P. Björntorp y B. Hood, *Metabolism*, 15, 370, 1966), cuya localización y regulación, así como el ulterior destino de los productos de hidrólisis, no están bien aclarados.

La resultante lipolítica del tejido adiposo —fruto de la coexistencia de procesos de síntesis y degradación de triglicéridos— viene gobernada por factores metabólicos, endocrinos y nerviosos; unos como factores de movilización y otros como factores inhibidores de la transformación triglicéridos → ácidos grasos, es decir, inhibidores de la lipomovilización.

La DEGRADACIÓN y LA BIOSÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS en el tejido adiposo viene controlada: a) por la presencia de LIPASAS TISULARES localizadas en los microsomas, una de ellas hormosensible y sujeta a su activación por catecolaminas, ACTH, glucagon y hormona tireotropa; b) por el AMP CÍCLICO, cuyos diferentes niveles influyen de modo distinto la actividad lipolítica del tejido adiposo (M. A. Rizack, *J. Biol. Chem.*, 239, 392, 1964); c) el ESTADO ENERGÉTICO de la célula adiposa en la que la presencia de glucosa se traduce en la forma-

ción de ATP, necesario a la síntesis de triglicéridos, que al resultar favorecida controla los niveles de ácidos grasos libres; d) CONTROL HORMONAL de la lipólisis ejercido; 1) por la insulina con sus acciones directa e indirecta por medio del aumento en la utilización celular de la glucosa, y 2) por las prostaglandinas, cuyo control de los ácidos grasos libres responde a un impreciso mecanismo; e) acción directa sobre la lipomovilización del SISTEMA NERVIOSO ortosimpático y acción indirecta por sus efectos vasomotores.

En presencia de un adecuado metabolismo hidrocarbonado, el balance entre lipólisis y esterificación se cambia en la dirección de la síntesis de glicéridos. La formación neta de ácidos grasos es muy pequeña, aun cuando la lipólisis continúe su acción en el tejido adiposo. Bajo la influencia de muchos agentes, este equilibrio se desplaza aún en presencia de un metabolismo adecuado de hidratos de carbono.

El MECANISMO DE ACTUACIÓN de estos factores, así como de los agentes que contribuyen a su regulación, es ciertamente complejo y modelo de interacción múltiple. Los agentes que actúan en el interior del tejido adiposo pueden hacerlo bien directamente sobre el proceso mismo que conduce a la liberación de ácidos grasos o sobre las etapas de activación o inhibición de este proceso que, promovidas por factores externos, ocurren a nivel de tejido adiposo. Los agentes que operan en localizaciones distintas del tejido adiposo pueden concretar su actuación bien en relación con la producción de inhibidores o movilizadores naturales o con las etapas que transcurren entre la liberación exterior de éstos y la entrada en el tejido adiposo; en ambos casos se tratará, pues, de agentes con una acción exterior al tejido adiposo.

La definición, sin embargo, del punto de actuación de estos agentes reguladores que modulan la lipomovilización por acción sobre los factores directos de movilización y de inhibición, es una cuestión muchas veces de difícil establecimiento. Dificultades que surgen, sobre todo, de la multiplicidad de interacciones y de la diferente conducta de idénticos factores en sistemas "in vitro" e "in vivo". Como ejemplo de interacciones tenemos la adrenalina; esta hormona de la médula suprarrenal estimula la formación de ácidos grasos libres, pero a la vez estimula la producción hepática de glucosa; y como quiera que, por otro lado, la glucosa antagoniza la lipomovilización y la hiperglucemia inhibe la secreción de la hormona de crecimiento, movilizadora de la secreción de ácidos grasos, resultan efectos contrapuestos a los anteriores.

Como ejemplo de conducta desigual "in vivo" e "in vitro" tenemos la exhibida por tres inhibidores de la movilización, glucosa, ácido nicotínico y las prostaglandinas. Así, la glucosa "in vitro" inhibe la liberación de ácidos grasos por una estimulación del proceso de esterificación (M. Vaughan, *J. Lipid Res.*, 2, 293, 1961), pero de modo concomitante puede observarse una estimulación

de la lipólisis puesta de manifiesto en la mayor presencia de glicerina; estimulación provocada de modo directo por la glucosa o por alguno de sus metabolitos o debida a un control "feedback" de la lipólisis por parte de la glucosa. Frente a estos efectos "in vitro", la glucosa "in vivo" inhibe la liberación de glicerina en el tejido adiposo (L. A. Carlson, *An. N.Y. Acad. Sciences*, 131, 119, 1965) por interferencia con algunos de los factores hormonales o nerviosos que influyen en la lipólisis.

Subrayada la participación de diversas hormonas como uno de los factores más importantes en los fenómenos de regulación de lipólisis, la averiguación de sus mecanismos de acción ha servido para establecer un ESQUEMA GENERAL DE COMPORTAMIENTO HORMONAL basado en el concepto de doble mensajero (E. W. Sutherland, I. Oye y R. W. Butcher, *Recent Progr. Hormone Res.*, 21, 623, 1965). Según este concepto, la hormona —primer mensajero— interacciona con objetivos concretos en localizaciones celulares específicas, por lo general la membrana celular, dando lugar a un segundo mensajero cuya actuación conduce a una modificación de las actividades enzimáticas celulares.

Uno de los objetivos mejor conocidos hasta ahora de la acción de las hormonas es la adenil-ciclase, que en su actuación sobre el ATP origina el 3',5'-AMP cíclico —segundo mensajero—, responsable de un segundo objetivo que varía según la naturaleza del tejido (formación de fosforilasa *a* a partir de fosforilasa *b*, producción de ácido láctico, estímulo de la síntesis de glucocorticoides, etc.).

Al lado de la adenil-ciclase hormonalmente estimulada, colabora en la regulación de la lipólisis otro sistema enzimático, la 3',5'-nucleótido cíclico fosfodiesterasa que destruye el AMP-cíclico (I. I. Davies, *Nature*, 218, 349, 1968).

Sustancias bloqueadoras de la acción del primer mensajero han de inhibir la acción fisiológica final, y su mecanismo de acción tendrá un reflejo antilipolítico.

A este propósito de la ACCIÓN ANTILIPOLÍTICA, una mención breve hará resaltar el sucesivo interés que viene cobrando la actividad de las prostaglandinas, familia de compuestos íntimamente relacionados (prostaglandinas  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $F_{1\alpha}$ ,  $F_{2\alpha}$ ,  $F_{3\alpha}$ ,  $F_{1\beta}$ ), inhibidores de la movilización de ácidos grasos y cuya biosíntesis tiene lugar a partir de los ácidos grasos esenciales (S. Bergström, H. Danielsson y B. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 207, 1964; D. A. van Dorp, R. K. Beerthuis, D. H. Nugteren y H. Vonkeman, *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 204, 1964).

Ya en 1963 (D. Steinberg, M. Vaughan, P. J. Nestel y S. Bergström, *Biochem. Pharmacol.*, 12, 764, 1963) se comprobó la acción de la  $PGE_1$  en el sentido de contrarrestar la acción lipolítica "in vitro" de adrenalina, ACTH y glucagon. Las prostaglandinas  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$  inhiben "in vivo" la capacidad lipo-

lítica de las catecolaminas con una disminución de los ácidos grasos libres del plasma. Su mecanismo de acción está basado (D. Steinberg y M. Vaughan, *Nobel Symp. II, Prostaglandins, Stockholm, Almquist y Wiksell*, pág. 109, 1967; R. W. Butcher, E. J. Pike y E. W. Sutherland, *Ibid*, pág. 133, 1967) en la interferencia que ejercen sobre la formación de AMP cíclico, bloqueando de este modo la actividad hormonal.

Las diferencias de comportamiento que exhiben localizaciones distintas de tejido adiposo tienen un reflejo en la distinta actividad antilipolítica que ejerce la prostaglandina E<sub>1</sub> sobre tejido adiposo subcutáneo y omental; diferencias que se basan en la variación de niveles de AMP cíclico en ambos tejidos (L. A. Carlson y D. Hallberg, *J. Lab. & Clin. Med.*, 71, 368, 1968).

Como consecuencia de la acción de las lipasas en el tejido adiposo se liberan ácidos grasos que van a ser captados y metabolizados por el hígado, tejidos periféricos y por el mismo tejido adiposo (J. L. Knittle y J. Hirsch, *J. Lipid Res.*, 6, 565, 1965; B. Shapiro, J. Chowers y G. Rose, *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 115, 1957; M. Vaughan, D. Steinberg y R. Pittman, *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 154, 1964).

Sin embargo, la captura de ácidos grasos libres por el tejido adiposo no es importante desde un punto de vista cuantitativo; su previa transformación en triglicéridos bajo la forma de lipoproteínas constituye el principal mecanismo de retorno de los ácidos grasos libres al tejido adiposo.

Entre las diferentes fracciones lipídicas transportadas por el plasma, los **ÁCIDOS GRASOS LIBRES** poseen una marcada actividad metabólica. Hasta 1956 (V. P. Dole, A. T. James, J. P. Webb, M. A. Rizack y M. F. Sturman, *J. Clin. Invest.*, 35, 150, 1956) no se dispone de una metodología simple y rápida para su determinación cuantitativa, y aunque sus niveles no alcanzan en condiciones normales un 5 por 100 del total de ácidos grasos plasmáticos, su importancia fisiológica fue pronto subrayada (R. S. Gordon y A. Cherkas, *J. Clin. Invest.*, 35, 206, 1956; S. Laurell, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8, 81, 1956).

Su naturaleza, su origen, el modo de transporte, su captura y transformaciones celulares van a constituir los aspectos en los que se centra el estudio de los ácidos grasos libres.

Una gran dispersión biológica, debida sobre todo a la naturaleza de los lípidos alimenticios, exhibe la composición de los ácidos grasos libres plasmáticos; sus ingredientes más importantes son (B. Descomps, P. Barjon y A. C. Paulet, *Pathologie-Biologie*, 15, 78, 1967):

ácido oleico (18:1) .....	25-50 %
ácido palmítico (16:0) .....	21-27 %
ácido linoleico (18:2) .....	5-20 %

ácido esteárico (18:0) .....	2-16 %
ácido palmítico (16:1) .....	2-10 %

y menores proporciones de linolénico (18:3), araquidónico (20:4), mirístico (14:0) y miristoleico (14:1).

En el hombre, la vida media de los ácidos grasos libres plasmáticos es de uno a dos minutos, y al cabo del día se renuevan normalmente unos 160 g, lo que significa en su combustión completa una producción de 1.440 calorías; magnitud que destaca la importancia de estos ácidos grasos en el balance energético del organismo y su contribución a las necesidades calóricas basales del hombre.

Los niveles de estos ácidos grasos libres en el plasma van a ser el balance de la acción antagonista de una resultante lipolítica en el tejido adiposo —de un lado— y la captura celular —de otro—, fenómenos ambos ligados a las disponibilidades de glucosa en los tejidos periféricos. Puesto que esta captura celular por el hígado, riñón, miocardio, músculo esquelético, etc., es, a su vez, función de la concentración arterial de ácidos grasos, el tejido adiposo y su metabolismo fundamentan uno de los más importantes sistemas reguladores.

Por los bajos niveles plasmáticos de ácidos grasos, variaciones pequeñas en su liberación, fruto de la resultante lipolítica del tejido adiposo o en su fijación periférica, dan lugar a importantes fluctuaciones en dichos niveles.

La formación de los ácidos grasos libres va a utilizar como sustratos casi exclusivos los triglicéridos presentes en el tejido adiposo (R. S. Gordon y A. Cherkas, *J. Clin. Invest.*, 36, 810, 1957), formación que se acompaña del aumento de glicerina (M. S. Raben y C. H. Hollenberg, *J. Clin. Invest.*, 38, 484, 1032, 1959; I. Reshef y B. Shapiro, *Metabolism*, 9, 551, 1960; M. Vaughan, *J. Lipid. Res.*, 2, 293, 1961) y sin que apenas tenga significación la hidrólisis de los triglicéridos circulantes. La velocidad de síntesis de triglicéridos es el mayor determinante de la velocidad de liberación de ácidos grasos libres.

Puede establecerse en consecuencia como los ácidos grasos libres plasmáticos representan la fracción circulante de los lípidos de reserva con su procedencia esencial del tejido adiposo. Su presencia (180-785  $\mu\text{eq/l}$ ) va a ser responsable en gran proporción del rendimiento energético del organismo y van a producirse elevaciones en la resistencia al frío y al ayuno, en la adaptación neonatal y al esfuerzo y como reacción frente situaciones psíquicas diversas.

*El fundamento fisiopatológico y terapéutico de la regulación de los niveles de los ácidos libres descansa en el control por las hormonas adipocinéticas y en su interacción con el metabolismo hidrocarbonado.*

*El progreso en el conocimiento de la regulación de estos niveles irá permitiendo obtener datos cada vez más precisos acerca de las endocrinopatías y de*

*la obesidad. Excesos de movilización con la elevación de los niveles, modifica la síntesis, el almacenamiento y la liberación de triglicéridos por el hígado, procesos implicados en las hiperlipemias y en la esteatosis hepática; elevaciones que pueden ocasionar ciertos estados diabéticos al modificar el metabolismo glucídico; elevaciones que resultarán controladas en presencia de los inhibidores de la lipomovilización.*

Desde un punto de vista fisiológico, el problema fundamental está basado en definir las reacciones bioquímicas que "in vivo" y en respuesta a determinados estímulos puedan influirse de modo rápido y reversible para originar una neta formación de grasas o una gluconeogénesis. Al hallazgo de esta reacción primera, de este mecanismo básico de control, han ido encaminados brillantes estudios de regulación; mecanismo básico que ha de regir la accesibilidad de los ácidos a las mitocondrias hepáticas. Esta accesibilidad tiene que estar lógicamente fundada en la primera liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo y seguida de una transferencia al nivel mitocondrial; para que esta traslocación ocurra hacia el complejo ácido graso-oxidasa, los ácidos tienen que activarse de modo adecuado con lo que se puede lograr, a base de esta posibilidad, una capacidad de modulación en la velocidad de oxidación de los ácidos grasos. De esta manera, la velocidad de traslocación de los restos ácidos a través de las membranas mitocondriales sería una etapa controladora de la oxidación de los ácidos grasos; en este sentido se atribuye un papel destacado a la formación de acil-carnitinas y a sus correspondientes transferasas (I. B. Fritz, *Persp. Biol. & Med.*, 10, 643, 1967). La alteración de esta reacción llevará consigo una sucesiva serie de variaciones en el ordenado conjunto de la regulación de este sistema; ello porque los ácidos grasos mismos influyen la actividad de diversas enzimas y porque distintos intermediarios de su oxidación gobiernan asimismo la actividad de enzimas catalizadoras de etapas decisivas en la síntesis de grasas y en la gluconeogénesis.

Los ÁCIDOS GRASOS LIBRES del plasma resultantes de modo primordial de la hidrólisis de triglicéridos en el tejido adiposo son UTILIZADOS POR LOS TEJIDOS entre los que el hígado se encarga de esterificarlos de nuevo o de oxidarlos. La esterificación los transforma en triglicéridos o fosfolípidos, que son segregados por el hígado bajo la forma de lipoproteínas; la oxidación conduce a acetyl-CoA, que puede originar compuestos cetónicos o ingresar en el ciclo cítrico para quemarse completamente a CO<sub>2</sub>.

De esta manera, los ácidos grasos libres tienen que exhibir un balance entre la fracción que se conserva por esterificación y la que se cataboliza por  $\beta$ -oxidación. De modo lógico, el primer factor que va a intervenir es la magnitud del flujo de ácidos grasos libres a partir del tejido adiposo; una fracción va a esterificarse con arreglo a la disponibilidad de hidratos de carbono, siendo esta

capacidad superior dependiente del mayor contenido en glucógeno. La oxidación de los ácidos grasos se suprime cuando incrementa la utilización de glucosa, en gran parte porque la formación de glicéridos se promueve al incrementarse la formación de  $\alpha$ -glicerofosfato a partir de glucosa. La magnitud de ácidos grasos libres que escapa a la esterificación puede degradarse con arreglo a dos procesos energéticamente muy distintos: el proceso cetogénico de bajo rendimiento energético o el proceso oxidativo de elevada producción de energía. Y son los requerimientos energéticos del hígado los que van a definir la relatividad de las distintas participaciones (P. A. Mayes y J. M. Felts, *Nature*, 215, 716, 1967).

Los ácidos grasos libres extracelulares resultan de un transporte, a través de membranas, de los correspondientes intracelulares, y sus niveles van a ser la resultante de procesos que tienden a su liberación y de procesos que tienden a su desaparición.

*En resumen, al primer tipo de procesos responden la lipólisis del tejido adiposo, con el control hormonal de su movilización, y la formación, a partir de triglicéridos de quilomicrones y lipoproteínas extracelulares, también con el correspondiente control hormonal de la lipoproteína-lipasa; al segundo tipo pertenecen la oxidación celular en distintos tejidos y la reesterificación a triglicéridos.*

A la complejidad del metabolismo intermediario lipídico representada por estos procesos, los sistemas enzimáticos particulares y los mecanismos de regulación hormonal, se unen dos nuevas circunstancias. De un lado, la biosíntesis "de novo" de los ácidos grasos en los tejidos contribuye a completar esta integración con los diferentes mecanismos del proceso de formación de ácidos grasos de cadenas largas y de su desaturación, el efecto regulador por los intermediarios del ciclo tricarbóxico, la participación de la proteína transportadora de ácidos y el alto grado de organización de los complejos multienzimáticos de la síntesis. En segundo término, las diferencias en las características metabólicas del tejido adiposo de las distintas especies de vertebrados e invertebrados, consecuencia de su distinta organización metabólica, función fisiológica y respuesta hormonal, contribuyen asimismo a establecer una mayor complicación en la regulación de la lipólisis y a significar la importancia de los aspectos comparados.

Los niveles de ácidos grasos libres plasmáticos participan en procesos fundamentales de REGULACIÓN METABÓLICA.

La mayor proporción de esterificación de los ácidos grasos libres en dependencia de los superiores niveles de glucógeno en el hígado es un simple indicio del grado complejo de relaciones entre los metabolismos de lípidos y de hidratos de carbono.

A la acción anti-lipolítica de la insulina en la regulación de la lipólisis —ya mencionada— se unen la inhibición de la utilización de la glucosa por los ácidos grasos y la concomitante elevación de la gluconeogénesis como manifestaciones principales de estas relaciones. La interferencia está basada en observaciones que los ácidos grasos de cadena larga influyen ciertas actividades enzimáticas que catalizan etapas controladoras de la velocidad en el metabolismo hidrocarbonado. Efectivamente, en condiciones de ayuno y diabetes favorecedoras de la gluconeogénesis (C. N. Hales y P. J. Randle, *Lancet*, 1, 790, 1963; M. E. Tarrant y J. Ashmore, *Diabetes*, 14, 179, 1965) se elevan los niveles de ácidos grasos y disminuye la actividad de las enzimas glicolíticas glucoquinasa, fosfofructo-quinasa y pirúvico-quinasa (C. Weber, R. L. Singhal, N. B. Stamm, M. A. Lea y E. A. Fisher, *Adv. Enz. Reg.*, 4, 59, 1966) por inhibición ejercida por los ácidos grasos (C. Weber, M. A. Lea, H. J. H. Convery y N. B. Stamm, *Adv. Enz. Reg.*, 5, 257, 1967). Además, las enzimas esenciales a la gluconeogénesis, como glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-difosfatasa y las enzimas que participan en ambos procesos, glicolisis y gluconeogénesis, como fosfohexosa-isomerasa, aldolasa y láctico-deshidrogenasa, no son afectadas en su actividad por los ácidos grasos, por lo que éstos funcionan como reguladores metabólicos promoviendo la gluconeogénesis y haciendo disminuir la glicolisis.

La mayor longitud de la cadena de los ácidos grasos tiene un significado en esta regulación en el sentido de producir una inhibición más intensa “in vitro” de las enzimas glicolíticas (M. A. Lea y G. Weber, *J. Biol. Chem.*, 243, 1096, 1968); inhibición a su vez dependiente del tiempo y de la concentración.

Se han pretendido buscar otros mecanismos explicativos del aumento de gluconeogénesis inducida por los ácidos grasos como el incremento en la velocidad de formación de málico y aspártico (C. M. Veneciale, P. Walter, N. Kneer y H. A. Lardy, *Biochemistry*, 6, 2129, 1967), activación de pirúvico-carboxilasa (M. F. Utter, D. B. Keech y M. C. Scrutton, *Adv. Enz. Reg.*, 2, 49, 1964), pero falta aún comprobar en la célula la posible contribución de estos efectos ejercidos por los ácidos grasos.

Con estos antecedentes, no puede resultar extraño que anomalías en el metabolismo lipídico se consideren siempre inherentes a los estados diabéticos (G. Hamwi, O. García, F. Kruger, G. Gwinup y D. Cornwell, *Metabolism*, 11, 850, 1962) y que con frecuencia vayan éstos ligados a hiperlipemias (D. Adlerberg y L. Eisler, *J. Am. Med. Assoc.*, 170, 1261, 1959); relaciones de múltiple naturaleza y siempre notorio interés como las de insulina y metabolismo lipídico (H. Alp y L. Recant, *Metabolism*, 13, 609, 1964; J. D. Bagdade, D. Porte y E. L. Bierman, *Diabetes*, 17, 127, 1968), diabetes y ácidos grasos libres (R. Hodges y W. Krehl, *Amer. J. Clin. Nut.*, 17, 334, 1965), hidratos de carbono y metabolismo lipídico en la obesidad, estados prediabéticos y trastornos vascu-

lares ateroscleróticos (P. Randle, P. Garland, E. Newsholme y C. Hales, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 131, 324, 1965; L. E. Schaefer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 148, 925, 1968; F. L. Mitchell, J. Pearson y W. T. Strauss, *Diabetología*, 4, 105, 1968).

El transporte de los ácidos grasos en el plasma constituye el más importante de este tipo de procesos, en los que se encuentran implicados los distintos tipos de lípidos, pues aun cuando fosfolípidos y colesterol son cuantitativamente más importantes en el plasma, su transporte no tiene prácticamente significado.

Los ácidos grasos pueden transportarse como ésteres —glicéridos de modo principal—, cuyo origen es fundamentalmente exógeno, pero con una participación no bien definida aún de glicéridos sintetizados endógenamente; pero es bajo la forma de LIPOPROTEÍNAS como los lípidos plasmáticos no polares van a poderse solubilizar en el medio acuoso que el plasma significa. Además de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, las lipoproteínas son responsables del transporte de provitaminas y vitaminas liposolubles como carotenoides y tocoferoles (K. W. Walton y S. J. Darke, *Immunochem.*, 1, 267, 1964).

El conocimiento de las lipoproteínas como unidades funcionales y estructurales es aún insuficiente y resulta difícil diferenciar el metabolismo de los lípidos transportados del metabolismo de los que son contribuyentes estructurales de las lipoproteínas.

Esta unión de lípidos y proteínas, y por la diversidad de ambos ingredientes, va a originar un espectro complejo de compuestos cuya densidad oscila de 0.9 a 1.2 g/ml. En el suero humano se describen en la actualidad las siguientes clases y características:

	Sedimentación	Densidad	Colesterol	Fosfolípidos	Triglicéridos	Proteínas
Quilomicrones .....	$S_f > 5.000$	< 1.006	6	4 %	90 %	1 %
Lipoproteínas (muy baja densidad) ...	$S_f 20-5.000$	< 1.006	10	6-15	64-80	2-13
$\beta$ -Lipoproteínas (baja densidad) .....	$S_f 0-20$	1.006-1.063	34	25	7	32
$\alpha$ -Lipoproteínas (alta densidad) .....	$-S_{12} 0-12$	1.063-1.210	17	27	7	49
Lipoproteínas (muy alta densidad) ...		> 1.210	(proteína-fosfolípido + albúmina-ácidos grasos libres)			

(R. H. Furman, P. Alaupovic y A. Gustafson, "Pathophysiologische und klinische Aspekte des Fettstoffwechsels", Ed. G. Schettler, G. Thieme Verlag, 1966).

El estudio de las lipoproteínas, desde muy variados puntos de vista, constituye uno de los aspectos más actuales y destacados.

Cada una de estas fracciones puede subfraccionarse; así, a partir de la fracción de "muy baja densidad" (VLD) se consiguen cinco subfracciones:

A ( $S_f > 5000$ ), B ( $S_f$  400-5000), C ( $S_f$  100-400), D ( $S_f$  50-100) y E ( $S_f$  20-50) por centrifugación diferencial en soluciones reguladoras ( $d = 1.006$  g/ml) (A. Gustafson, P. Alaupovic y R. H. Furman, *Biochemistry*, 4, 596, 1965). En estas subfracciones, a medida que aumenta el tamaño, el contenido lipídico incrementa y el proteico disminuye.

Por lo que a las proteínas se refiere, existen al menos tres tipos de proteínas o polipeptidos implicados de modo específico en el transporte de lípidos: proteína A (también proteína  $\alpha$ ), constituyente de las proteínas de alta densidad, con aspártico  $-NH_2$  terminal y treonina  $-COOH$  terminal, peso molecular 35-37.000 con una molécula de cisteína por molécula de proteína y posiblemente asociada en un estado tetrámero. Inmunoquímicamente se ha demostrado la presencia de dos formas antigénicas de proteína A (A. Scanau, *J. Lipid Res.*, 7, 295, 1966). La proteína B (proteína  $\beta$ ) posee ácido glutámico como residuo  $-NH_2$  terminal y serina como  $-COOH$  terminal, y un peso molecular aproximado de 300.000, posiblemente constituido por subunidades de peso molecular mínimo de 100.000, que circulan en el plasma en varios grados de polimerización; es de difícil manipulación por la rápida desnaturalización que se produce al eliminar los lípidos.

Las lipoproteínas de muy baja densidad ( $S_f > 20$ ), aisladas de suero de sujetos hiperlipémicos, una vez deslipidizadas parcialmente, rinden una mezcla de tres tipos de proteína-fosfolípido (A. Gustafson, P. Alanpovic y R. H. Furman, *Biochemistry*, 5, 632, 1966), 4S, 14S y 7S. Desde los puntos de vista químico, químico-físico e inmunológico, las fracciones proteicas de 4S y 14S corresponden a las denominadas A y B. El resto 7S contiene una proteína denominada C, caracterizada por la presencia de treonina y serina como aminoácidos  $NH_2$ -terminales.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLD-lipoproteínas) son antigénicamente idénticas a las  $\beta$ -lipoproteínas (K. W. Walton y S. J. Darke, *Inmunochimistry*, 1, 267, 1964); sin embargo, después de una lipólisis o tratamiento con éter se pueden detectar los dos tipos A y B de proteínas. La proteína A parece estar cubierta de lípido, pues es incapaz de migrar con su habitual movilidad, y no reacciona con el antisuero específico a la lipoproteína. Por el contrario, las  $\beta$ -lipoproteínas, proteínas de baja densidad, con límites de densidad estrechos  $S_f$  0-20, contienen tan sólo proteína B sin posibilidad de detección de la proteína A, aún después de deslipidación. Algunos autores consideran conjuntamente las lipoproteínas de baja densidad que luego distinguen en tres subclases:  $S_f$  3-9, 10-20 y 20-100.

Las lipoproteínas de elevada densidad,  $\alpha$ -lipoproteínas, son heterogéneas desde un punto de vista antigénico, habiéndose sugerido la existencia de tres tipos distintos con misiones específicas de transporte de colesterol o de triglicéridos.

Estas lipoproteínas de alta densidad contienen alrededor de cincuenta por ciento de proteínas, y su densidad varía entre los límites 1.06 y 1.21. Parece probable la existencia de una continua variación en la composición de lípidos unidos a una proteína (R. I. Levy y D. S. Frederickson, *J. clin Invest.* 44, 426, 1965).

La distinta naturaleza de los restos de apolipoproteínas, la existencia de ligeras diferencias estructurales en la secuencia de las cadenas polipeptídicas con su correspondiente control genético, el mayor o menor grado de lipidación y los diferentes estados de polimerización son la causa del amplio espectro de lipoproteínas existente y de sus distintas características físico-químicas.

En este terreno, siempre difícil, de las lipoproteínas debe subrayarse que las técnicas químico-físicas utilizadas para el fraccionamiento conducen inevitablemente a la formación artificial de agregaciones; sobre todo, las lipoproteínas de muy baja densidad son muy difíciles de aislar y estudiar.

Cualquier cambio en los niveles de lípidos plasmáticos es, por lo general, el resultado de una variación en los niveles de una o más clases de lipoproteínas. Las variaciones en los niveles plasmáticos de lipoproteínas son debidas a modificaciones anormales de su secreción hepática, no compensados por las velocidades de desaparición. La secreción anormal de lipoproteínas hepáticas puede obedecer a causas diversas, como el aumento en el suministro de colesterol o ácidos grasos libres al hígado, que se traduce en un estímulo del vertido al plasma de lipoproteínas de baja densidad o ricas en triglicéridos, respectivamente.

*El logro de correlaciones entre la naturaleza de lípidos y proteínas de este tipo de lipoproteínas y los síndromes hiperlipémicos ha de arrojar mucha luz sobre su etiología y las condiciones terapéuticas y de diagnóstico.*

La presencia de lípidos en plasma, con su gran diversidad, da lugar a toda una variación de "hiperlipemias esenciales". Los términos "hipertrigliceridemia", "hipercolesteremia" e "hiperlipemia" han sido ampliamente utilizados en la literatura de los años 50 para denominar estados patológicos de oscura etiología, caracterizados por la simple o múltiple utilización de lípidos plasmáticos. La utilización clínica de los procedimientos de fraccionamiento de lipoproteínas ha conducido a la demostración de que los lípidos, como constituyentes de las lipoproteínas, varían de modo paralelo a éstas; con este criterio, las hiper- o hipo-lipemias se refieren, en la actualidad, a las variaciones habidas en el conjunto lipoproteico.

En condiciones normales, la composición lipídica constante de las lipoproteínas es un reflejo del equilibrio existente entre las afinidades de las proteínas portadoras por los diversos lípidos; equilibrio que puede desplazarse en ciertas condiciones patológicas, como la cirrosis biliar, en que la naturaleza de los lípidos integrantes de las lipoproteínas de alta y baja densidad es reflejo del desequilibrio producido por el retroceso en la sangre de fosfolípidos y colesterol,

a causa del bloqueo de su final excreción en la bilis. Aun dentro de un estado normal, la concentración de lipoproteínas de baja densidad varía con la edad y sexo.

Durante los últimos años se han acumulado datos sobre la significación funcional de las lipoproteínas, descubriéndose una variedad de condiciones patológicas que exhiben variaciones en las concentraciones de lipoproteínas en plasma, siendo escasas las deficiencias de índole congénita. Estas ALTERACIONES DE LIPOPROTEÍNAS se van a presentar, pues, de modo esencial como anomalías del transporte de lípidos, y podrán ser hereditarias (forma primaria) o ser expresión de una alteración metabólica debida a otra enfermedad identificable (forma secundaria). Tanto en las hiperlipemias primarias como secundarias, se ha comprobado un incremento del conjunto total intercambiable de lipoproteínas de baja densidad, reflejado en una elevación de ambos niveles intra- y extravascular con independencia de las alteraciones metabólicas del componente proteico. Este aumento de la presencia extravascular de lipoproteínas de baja densidad se produce en las paredes arteriales y en el tejido subcutáneo, dando lugar a una mayor incidencia de aterosclerosis y a la existencia de xantomatosis, respectivamente (P. J. Scott y C. Winterbourn, *J. Atheroscler. Res.*, 7, 207, 1967).

*Con esta simple mención queda subrayada la trascendencia del control de lípidos y lipoproteínas del suero, que, en palabras de Walton (K. S. Walton, J. Atheroscler. Res., 7, 533, 1967), no debe considerarse como un mero ejercicio académico para rectificar una anormalidad bioquímica, sino como un medio de profilaxis y tratamiento de la aterosclerosis.*

Mas también a través de esta ligera insinuación puede entreverse una *nueva concepción de la Patología*, que ha supuesto una honda renovación del pensamiento científico, así como una mutación metodológica; ellas han abierto el camino al conocimiento más profundo de la etiología y a mejores posibilidades terapéuticas.

La Bioquímica, en su progreso, ha incidido sobre la Medicina Experimental; pero el hecho más sobresaliente de esta incidencia, lo que de verdad constituye el hecho nuevo y determinante, es la convergencia de disciplinas biológicas—entre las que se cuenta la Bioquímica, la Genética, la Citología, la Embriología y las disciplinas Morfológicas— de modo que este conjunto, esta nueva concepción de la Biología, al influenciar la Medicina Experimental comienza a apuntar una ruptura con el pensamiento anterior.

Como ejemplo y manifestación de estos encuentros tenemos la relación de la Bioquímica y la Morfología.

La Bioquímica, que establece los mecanismos de los procesos químicos en las entidades biológicas, llega a seleccionarlos según el tipo de compartimento

celular y llega a definir, en términos químicos y químico-físicos, la ultraestructura celular.

Frente a ello, la observación morfológica con los progresos técnicos recientes permite atribuir las imágenes obtenidas a la presencia de estructuras de proteínas, de glucógeno, de ácidos nucleicos, etc.

La conjunción de estas dos disciplinas se realiza en el terreno, pues, de lo molecular. Y a este terreno, y bajo este aspecto de lo molecular, se van considerando y se van uniendo con una evolución ya conjunta facetas científicas hasta entonces un tanto herméticas a otras influencias. A este respecto, sólo la simple mención de cómo la Genética reduce en último análisis los procesos vitales a las influencias mutuas de dos tipos de moléculas: proteínas y a. nucleicos. Idea ya en vigor hace bastantes años, y que en 1908 haría comentar a Haldane: "... el genetista de hoy se encuentra en difícil posición, sus conocimientos tienen que abarcar la citología, la anatomía y la taxonomía, al lado de la física y las matemáticas y aún la psicología, si bien algunas veces olvida que la mayoría de los fenómenos fundamentales que estudia pueden reducirse finalmente a un hecho bioquímico..."

A la vista —en primer lugar— del impacto sobre la Medicina Experimental por parte de la Biología y de la concepción molecular de ésta como nexo común de la multiplicidad de tratamientos, es lógica la consecuencia de la interpretación a nivel molecular de la causa de las enfermedades o **PATOLOGÍA MOLECULAR**.

Las alteraciones moleculares hereditarias pueden radicar en los cromosomas mismos, pueden ser anomalías de expresión y pueden ser aberraciones de los sistemas de control. El conocimiento de esta alteración deberá ser la primera etapa para un tratamiento completo de estas alteraciones a nivel molecular, a la que deberán de seguir otras que muestren cómo ello ha repercutido en la síntesis y en la actividad específica de una proteína, qué consecuencias secundarias de tipo bioquímico se han originado y cuál es la causa de los síntomas observados y que constituyen el fenotipo clínico de la enfermedad.

Un tratamiento de este tipo es hoy prácticamente imposible para la gran mayoría de las enfermedades hereditarias, pero va acumulando datos de modo parcial en la comprensión de la Patología molecular. La detección y el tratamiento de las múltiples formas de enfermedades genéticas demandan mucha atención en la diversidad de los aspectos científicos implicados.

En el terreno de los lípidos, las alteraciones pueden centrarse en su absorción —de un lado— y en su metabolismo —de otro—.

## ALTERACIONES CLINICAS DE LA ABSORCION DE LIPIDOS

### I. ALTERACIONES DE LA LIPOLISIS INTRALUMINAL

Deficiencia de sales biliares.

Deficiencias de enzimas pancreáticas.

## 2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO INTRAMUCOSAL

Esterificación de lípidos:

- a) Desórdenes de mucosa.
- b) Insuficiencia hormonal adrenal.

Síntesis de lipoproteínas:

- a) Naturaleza genética: Deficiencia  $\beta$ -lipoproteína.
- b) Inducida por drogas: Puromicina.

## 3. OBSTRUCCIÓN LINFÁTICA

Los triglicéridos de la dieta por acción de las lipasas pancreáticas y las sales biliares en el lumen intestinal se transforman predominantemente en monoglicéridos y ácidos grasos. Ambos productos, con la participación de las sales biliares, forman micelas, bajo cuya forma se transportan a la mucosa intestinal y en la que descargan su contenido lipídico.

Después de su entrada en las células de la mucosa, los monoglicéridos y los ácidos grasos se reesterifican a triglicéridos por una serie de enzimas que radican en el retículo endoplásmico. Una vez formados los triglicéridos, la célula procede a la formación de quilomicrones con capas exteriores de lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos, bajo cuya forma se secreta en los espacios intercelulares.

Todas estas etapas de la absorción de lípidos pueden resultar alteradas, bien en la lipólisis en el lumen, bien en el metabolismo de las mucosas o, en tercer lugar, por obstrucción linfática. De naturaleza genética pueden ser deficiencias pancreáticas de enzimas como la fibrosis cística, antes mencionada, o deficiencias en la síntesis de  $\beta$ -lipoproteínas. Esta deficiencia en la capacidad de síntesis de  $\beta$ -lipoproteína ocasiona la falta de formación de quilomicrones, de igual manera a lo que sucede con la adición de puromicina o acetoxi-cicloheximida, inhibidores generales de la biosíntesis de proteínas. Debe señalarse a este respecto que esta anomalía se presenta sólo por lo que se refiere al metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, ya que los de cadena corta o media pasan directamente a la vena porta.

En cuanto a las anomalías metabólicas, son designadas bajo la común denominación general de Lipidosis, y son conducentes a variaciones en el reparto de lípidos o lipoproteínas en tejidos o líquidos extracelulares.

Desde el punto de vista de la naturaleza química de los lípidos que resultan alterados, las anomalías pueden reunirse en los siguientes grupos:

- LIPOPROTEÍNAS:** Hiperlipoproteinemias.  
Alipoproteinemias.
- ACIDOS GRASOS:** Acidos grasos de cadena corta (butírico y hexanoico).  
J. B. Sidbury, E. K. Smith y W. Harlan, *J. Pediat.*, 70, 8 (1967).  
3,7,11,15-Tetrametilhexadecanoico (enfermedad de Refsum).  
W. Kahlke y R. Richterich, *Am. J. Med.*, 39, 237 (1965).  
E. Klenk y W. Kahlke, *Z. Physiol. Chem.*, 333, 133 (1963).  
S. Laurell, *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 75 (1968).
- FOSFOGLICÉRIDOS:** Lipidosis cefalínica.  
H. S. Baar y E. M. Hickmans, *Acta Med. Scand.*, 155, 49 (1956).
- ESTEROIDES:** Acumulación de colesterol y sus esteres (enfermedad de Wolman).  
A. C. Crocker, G. F. Vawter, E. B. D. Neuhauser y A. Rosowsky, *Pediatrics*, 35, 627 (1965).  
Deficiencia de esterificación de colesterol.  
H. Torsvik, E. Gjone y K. R. Norum, *Acta Med. Scand.*, 183, 387 (1968).  
Deficiencia de colesteroesterasa.  
R. Infante, J. Polonovsky y J. Caroli, *Press Med.*, 75, 2829 (1967).
- TRIGLICÉRIDOS:** Metamorfosis grasa visceral.  
J. Peremans, P. J. de Graef, G. Strubbe y G. de Block, *J. Pediat.*, 69, 1108 (1966).
- ESFINGOLÍPIDOS:** Fosfoesfingolipidosis.  
Glicoesfingolipidosis.  
Gangliosidosis.

De todas estas anomalías del metabolismo lipídico vamos a destacar los fundamentos bioquímicos de las alteraciones de lipoproteínas, ácidos grasos y esfingolípidos.

El término "hipertrigliceridemia idiopática esencial" representa un espectro de alteraciones patológicas, en uno de cuyos extremos se presentan los casos de intolerancia extrema a todos los tipos de grasas alimenticias. Ahrens, en

1961 (E. H. Ahrens, J. Hirsch, K. Oette, J. W. Farguhar y Y. Stein, *Trans. Ass. Amer. Physicians*, 74, 134, 1961), demuestra, contra la opinión general, que la mayoría de las hipertrigliceridemias pueden inducirse por ingestión de hidratos de carbono más que por la de grasas, y Kinsell (L. W. Kinsell y G. Schlierf, *Metabolism*, 11 863, 1962; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 131, 606, 1965) subraya la participación del total de calorías ingeridas en el desarrollo de la hipertrigliceridemia esencial. A la luz de estos trabajos iniciales se imponía la distinción entre una HIPERLIPEMIA PRÁCTICAMENTE ALIMENTICIA, con una incapacidad del metabolismo normal de las grasas, en contraste con la HIPERLIPEMIA ENDÓGENA, no alimenticia, con una alteración del metabolismo endógeno de las lipoproteínas de muy baja densidad y en la que puede observarse la inducción por hidratos de carbono. Estos dos tipos se distinguen por simple inspección del suero; en la hiperlipemia inducida por grasas se forma una capa cremosa en la superficie con sólo dejar el suero en reposo durante la noche; en la inducida por hidratos de carbono, las lipoproteínas con velocidades de flotación más lentas aparecen difusamente distribuidas.

Hoy se conocen nuevos tipos y subdivisiones de hiperlipemias, cuya asignación precisa determinará la forma más apropiada de tratamiento.

La HIPERLIPEMIA FAMILIAR (hiperlipemia familiar inducida por grasas, hiperlipemia exógena persistente, hiperquilomicronemia, enfermedad de Bürger-Grütz) o HIPERLIPEMIA TIPO I, se caracteriza por una hiperquilomicronemia bajo la influencia de las grasas alimenticias. Esta fracción es extremadamente rica en triglicéridos —responsables del aspecto lechoso del suero— y pobre en colesterol, que en el suero alcanza niveles totales normales o inferiores. El defecto bioquímico radica en la deficiencia de una lipasa lipoprotéica que impide la captura de los lípidos por los tejidos. La enfermedad se transmite de modo recesivo y autosómico.

La existencia de este tipo de hiperlipemias de naturaleza secundaria es incierta.

La HIPERBETALIPOPROTEINEMIA, TIPO II (hipercolesteremia familiar esencial, xantomatosis hipercolesterémica, etc.), lleva consigo un aumento predominante de la fracción S<sub>1</sub>-3-9 de lipoproteínas de baja densidad ( $\beta$ -lipoproteínas) poseedora de elevados niveles de colesterol (colesterol total en suero, 400 mg %; colesterol en  $\beta$ -lipoproteína  $-d = 1.019$  a  $1.062-$ , 325 mg %) (\*). Este tipo de hipercolesteremia es de naturaleza dominante y va asociada a un incremento en la vulnerabilidad a la aterosclerosis. Este mismo tipo de hiperlipoproteinemia, pero de naturaleza secundaria, se encuentra comúnmente en síndromes de hipotiroidismo y nefróticos.

---

(\*) Datos de R. H. Furman en "Pathophysiologische und klinische Aspekte des Fettstoffwechsels", Ed. G. Schettler, G. Thieme Verlag, pág. 7, 1966.

La HIPERBETALIPOPROTEINEMIA, TIPO III, se caracteriza por un incremento de las  $\beta$ -lipoproteínas de baja densidad en su fracción  $S_f$  12-200 (sin aparición de quilomicronemia) con una densidad aproximada de 1.006. En esta hiperlipemia participan todas las clases de lípidos.

La HIPERBETALIPOPROTEINAMIA, TIPO IV (hiperlipemia endógena), se caracteriza por un aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad,  $d < 1.006$ , bajo la influencia de los glúcidos alimenticios. Anomalía muy común en que la fracción lipoproteica anterior posee elevados niveles de colesterol (colesterol en suero, 630 mg %; colesterol en lipoproteínas,  $d < 1.006$ , 564 mg %) (\*). La distribución del colesterol en las fracciones lipoprotéicas de esta anomalía es análoga a la distribución que exhibe la hiperquilomicronemia, si bien los niveles totales de colesterol en suero y los unidos a cada una de las lipoproteínas son muy superiores en la inducción por hidratos de carbono.

En esta hiperlipemia inducida por hidratos de carbono existen anomalías en el metabolismo de éstos (J. L. Knittle y E. H. Ahrens, *J. Clin. Invest.*, 43, 485, 1964; G. Schlierf y L. Kinsell, *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, 120, 272, 1965), lo cual viene confirmado porque la administración de insulina ocasiona una disminución de los niveles de glicéridos en plasma. Esta anomalía en el metabolismo de los hidratos de carbono puede representar un fenómeno secundario como respuesta a una alteración del metabolismo de los ácidos grasos libres, hecho de significación en la patogénesis de la diabetes mellitus (C. N. Hales y P. J. Randle, *Lancet*, I, 790, 1963).

Entre las dos condiciones extremas de inducción por grasas e hidratos de carbono existen individuos que adquieren hiperlipemias cuando bajo condiciones apropiadas están presentes en la dieta apreciables cantidades de grasas e hidratos de carbono con referencia particular al nivel absoluto y relativo de calorías. Casi todos los individuos de estas condiciones exhiben anomalías claras y ocultas de la tolerancia hidrocarbonada y son muy sensibles al efecto de la insulina exógena, aunque no aparezca disminución de insulina circulante determinada inmunológicamente.

Un TIPO V adicional de hiperlipoproteinemia, si bien muy raro, asocia la presencia de hiperquilomicronemia con hiperbetalipoproteinemia.

Frente a este conjunto de manifestaciones anómalas por exceso de lipoproteínas, se presentan casos más aislados y definidos de síndromes deficitarios que pueden centrarse en dos tipos: AN-ALFA-LIPOPROTEINEMIA y A-BETA-LIPOPROTEINEMIA. El estudio de estas enfermedades tiene un extraordinario interés porque permite una profundización en el conocimiento de la función de dos grandes tipos de lipoproteínas.

La AN-ALFA-LIPOPROTEINEMIA (enfermedad de Tangier) presenta un descenso en los niveles plasmáticos de colesterol y fosfolípidos y un aumento de los tri-

glicéridos. Frente a esta disminución de colesterol plasmático, se observa una sobrecarga en los histiocitos de nódulos linfáticos, hígado y bazo, tanto en forma libre como esterificado. Existe asimismo una deficiencia en el transporte de los glicéridos endógenos. La naturaleza del defecto genético y la correlación entre niveles de lipoproteínas de alta densidad, función retículo-endotelial y metabolismo lipídico, permanecen sin aclarar.

Deficiencias en este mismo tipo de alfa-lipoproteínas se producen en tratamientos continuados con testosterona y derivados, así como en la obstrucción biliar crónica.

La A-BETA-LIPOPROTEINEMIA (enfermedad de Bassen y Kornzweig, acantocitosis) exhibe un cuadro clínico complejo, con desórdenes congénitos caracterizados por anomalías de los glóbulos rojos (acantocitos), del sistema nervioso central (ataxia, retinitis pigmentosa) y de la mucosa (K. J. Isselbacher, R. Scheig, G. R. Plotkin y J. B. Caulfield, *Medicine*, 43, 347, 1964).

Ante la falta de  $\beta$ -lipoproteína, los triglicéridos se acumulan en las células de la mucosa intestinal sin poderse captar para la elaboración de quilomicrones y ser transportados en esta forma a los conductos linfáticos.

Una nueva entidad patológica, conocida como "HIPERLIPEMIA AUTOINMUNE", está caracterizada por elevados y variables niveles de lípidos plasmáticos y por la presencia de anticuerpos circulantes anti- $\beta$ -lipoproteína; estos datos van acompañados de una evidencia clínica de estados ateroscleróticos (J. L. Beaumont y col., *Nouv. Rev. Franc. Hémat.*, 5, 507, 782, 1965; *C. R. Acad. Sci.*, 260, 5960, 1965).

Las anomalías genéticas conocidas relacionadas de modo directo con el metabolismo de los ÁCIDOS GRASOS son escasas.

En la primera semana de vida se ha descrito un estado patológico con deshidratación, acidosis y olor desagradable en el aire exhalado, tejidos y fluidos biológicos (J. B. Sidbury, E. K. Smith y W. Harlan, *J. Pediatrics*, 70, 8, 1967). El dato analítico característico es la presencia de elevadas concentraciones de ácidos butírico y hexanoico en orina, motivada por la deficiencia de acil-deshidrogenasa específica de butiril-CoA y hexanoil-CoA que inicia la serie de reacciones que intervienen en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. La naturaleza genética de esta alteración es probablemente recesiva autosómica.

En 1946, Refsum describió una anomalía neurológica, asimismo recesiva autosómica (S. Refsum, *Acta Psychiat. Neurol. Scand. Suppl.*, 38, 1946) que había de caracterizarse después por la acumulación en suero y diversos órganos de un ácido muy singular, el ácido fitánico—3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico— (R. P. Hansen, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 304, 1965; W. S. Alexander, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 29, 412, 1966; M. Rake y M. Saunders, *ibid.*, 29, 417, 1966; S. Laurell, *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 75, 1968) de origen exclusi-

vamente exógeno (D. Steinberg, J. Avigan, C. Mize, L. Eldjarn, K. Try y S. Refsum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 783, 1965; W. Stoffel y W. Kahlke, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 19, 53, 1965) a partir del fitol de la dieta. La degradación normal del ácido fitánico ocurre lentamente por  $\omega$ -oxidación en microsomas de hígado,  $\omega$ -oxidación y subsiguiente  $\beta$ -oxidación (L. Eldjarn, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 17, 178, 1965) y por  $\alpha$ -oxidación (O. Stokke, K. Try y L. Eldjarn, *Biochim. Biophys. Acta*, 144, 271, 1967). Esta última vía degradativa parece ser está impedida y ser el fundamento bioquímico de la enfermedad de Refsum. Este síndrome es un buen ejemplo de cómo aún hoy día se identifican como alteraciones genéticas del metabolismo, enfermedades desde hace largo tiempo conocidas.

Integradas en el conjunto de alteraciones hereditarias del metabolismo lipídico, el planteamiento de las ESFINGOLIPIDOSIS ha significado un ejemplo singular de coincidencia de observaciones morfológicas e histoquímicas con estudios bioquímicos y averiguaciones genéticas; la complejidad estructural de los esfingolípidos y la multiplicidad de sus interrelaciones metabólicas con la dificultad consiguiente del análisis bioquímico de las modificaciones patológicas, mantiene aún la incógnita de la interpretación molecular de diversas anomalías.

Como quiera que en las ESFINGOLIPIDOSIS el sistema nervioso central resulta, por lo general, afectado, estas anomalías se conocen asimismo como lipidosis cerebrales o neurolipidosis, quizá un tanto erróneamente por la existencia de casos en que no está probada la acumulación de esfingolípidos en dicho sistema.

No cabe la menor duda que la excesiva acumulación de estos esfingolípidos en las esfingolipidosis, es debido a la existencia de una acción defectuosa por parte de los sistemas enzimáticos, implicados en el metabolismo de estos tipos de lípidos; como es general, su conocimiento profundo ha de ser previo a la descripción de cualquier alteración.

Por lo que a su biosíntesis se refiere, se llega a esfingomielinas, cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos, completándose de modo gradual las correspondientes estructuras químicas a partir de esfingosina por su reacción sucesiva con las formas activadas de los adecuados fragmentos. Así, la adición sucesiva de ácido graso y fosforilcolina da lugar a las *esfingomielinas*, diferentes según la distinta naturaleza del ácido graso. La adición de galactosa y ácido graso origina los *cerebrósidos* que pueden dejarse esterificar por la forma activa del sulfato, transformándose con ello en *sulfátidos*, o van a ser —a su vez— sustratos de una serie de reacciones enzimáticas conducentes a los *gangliósidos*. Estos cuatro grandes grupos de esfingolípidos van a resultar alterados en su metabolismo y se van a acumular distintos productos cuya naturaleza constituye la base de la clasificación bioquímica de las anomalías.

La transformación cerebrósidos-gangliósidos es clave en la interpretación de

ENZIMA	ESTRUCTURA	COMPUESTO
transferásica (T)	ceramida glucosa (4 ↔ 1) β-galactosa	GA3 Ceramida lactosido
Sialit - T	ceramida glucosa (4 ↔ 1) β-galactosa ↓ CMP - NAN NAN 2 3	GM3 Hematosido
N-acetil-galactosaminil-T	ceramida glucosa (4 ↔ 1) β-galactosa ↓ UDP-N-acetil-galactosamina NAN 2 3	GM2 Gangliosido Tay-Sachs
Galactosil - T	ceramida glucosa (4 ↔ 1) β-galactosa ↓ UDP-galactosa NAN 2 3	GM1 Monosialo-gangliosido
Sialit - T	ceramida glucosa (4 ↔ 1) β-Gal (4 ↔ 1) β-N-Ac Gal (3 ↔ 1) β-Galactosa ↓ CMP - NAN ceramida glu (4 ↔ 1) β-Gal (4 ↔ 1) β-N-acGal (3 ↔ 1) β-Gal NAN 2 3	GD1a Disialo-gangliosido

distintas esfingolipidosis. A partir de un disacárido tipo cerebrósido —la ceramida lactósido en el esquema adjunto— se van a ir incorporando sucesivamente a su estructura los fragmentos necesarios para rendir un gangliósido complejo. Esta incorporación tiene lugar en cuatro etapas, en cada una de las cuales interviene la forma activa del fragmento que se adiciona y la enzima transferásica correspondiente. Son estas etapas:

a) Incorporación de N-acetil-neuramínico o ácido siálico catalizada por la sialil-transferasa, con lo que resulta alargada la cadena carbonada en un resto de ácido siálico unido a la galactosa. Resulta así el denominado Hematósido.

b) Incorporación de N-acetil-galactosamina catalizada por la N-acetil-galactosaminil transferasa, con lo que resulta alargada la cadena en el resto de N-acetil-galactosamina por unión también a la molécula de galactosa.

c) Incorporación de galactosa catalizada por la galactosiltransferasa, con lo que se complica de nuevo la estructura.

d) Incorporación, finalmente, de un nuevo resto de N-acetil-neuramínico, catalizada por la sialiltransferasa, a la porción de galactosa anterior.

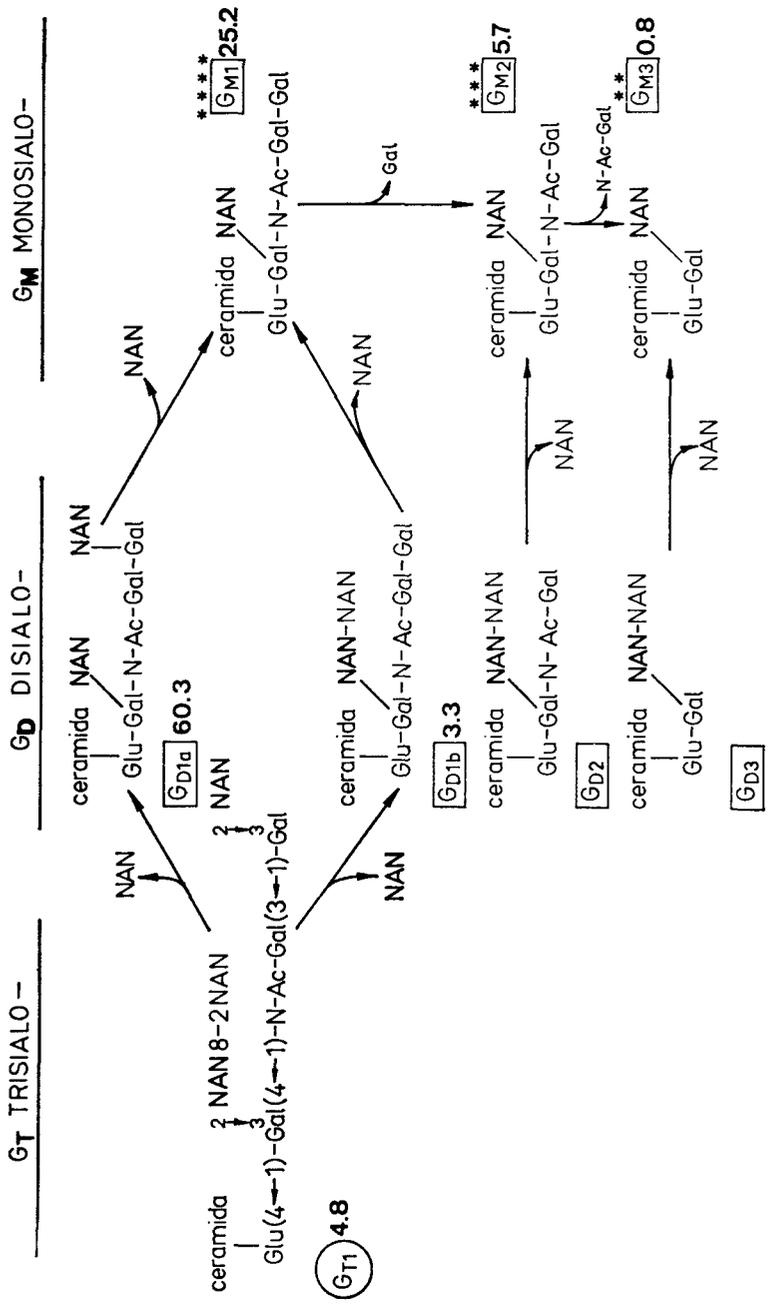
Resulta de esta manera que el cerebrósido inicial —ceramida lactósido— se ha visto complementado con N-acetil-galactosamina, galactosa y dos restos de N-acetil-neuramínico.

Estos gangliósidos, biosintetizados de esta manera y caracterizados desde un punto de vista químico por la presencia de ácido acetil-neuramínico (NAN), van a experimentar en condiciones normales una serie de reacciones catabólicas que van a poner en relación distintos compuestos con tres, dos o un restos de N-acetil-neuramínico en los denominados, respectivamente, trisialo-, disialo- y monosialo-gangliósidos.

Como se observa en el esquema adjunto, el trisialo-gangliósido ( $G_{T1}$ ) puede irse fragmentando, cediendo las distintas unidades constituyentes de la fracción hidrocarbonada y originando una gran variedad de productos de degradación.

A continuación se resumen las características metabólicas más importantes de los principales síndromes esfingolipídicos.

NIEMANN-PICK. En 1934 demostró Klenk que la excesiva acumulación de esfingomielinas en varios tejidos es una característica de la enfermedad de Niemann-Pick, con lo que comenzó a considerarse como esfingolipidosis, de la que se han descrito, distintos tipos de formas clínicas (A. C. Crocker, *J. Neurochem.*, 7, 69, 1961; D. S. Fredrickson, en "The Metabolic Basis of Inherited Disease", McGraw-Hill, 1966), cuya diferenciación a nivel bioquímico está basada en las variaciones del nivel de colesterol. Sin embargo, la biosíntesis de esfingomielinas en tejidos de pacientes de esta enfermedad es completamente normal, por lo que el defecto metabólico se centró en la deficiencia de una en-



zima catabólica. En efecto, utilizando esfingomielina-<sup>14</sup>C se ha demostrado la presencia en varios tejidos, sobre todo en hígado, y localizado de modo especial en los lisosomas, de una enzima que se ha solubilizado y purificado y que actúa específicamente sobre la esfingomielina (M. Heller y B. Shapiro, *Biochem. J.*, 98, 763, 1966). La acción de esta esfingomielinasa escinde el sustrato en ceramida y fosforil-colina y está presente en diversos tejidos, entre los que riñón e hígado exhiben la máxima actividad que llega a anularse en la enfermedad de Niemann-Pick.

Desde un punto de vista genético, esta enfermedad se transmite como recesiva, como lo prueba la incidencia familiar y la frecuencia de consanguinidad en padres. La incidencia ha sido estimada alrededor de 1:100.000, lo que corresponde a una frecuencia genética de 1/320 y una frecuencia de heterocigotos de 1/160. La mayoría de los casos, aunque con escasas excepciones (N. M. Faktselli, B. G. Delta, N. S. Araboglu y E. Y. Hudaverdi, *Clin. Pediatrics*, 7, 119, 1968), se han descrito en niños judíos (A. C. Crocker y S. Farber, *Medicine*, 37, 1, 1958).

GAUCHER. Esta enfermedad fue ya descrita en 1882, y es, con seguridad, la más frecuente de las esfingolipidosis. Se trata de un desorden metabólico que se traduce en el almacenamiento de cerebrósidos en el sistema retículo-endotelial de bazo, hígado y otros órganos, y que ofrece distintas variantes clínicas y neuropatológicas (M. Philippart y J. H. Menkes, en "Inborn disorders of sphingolipid metabolism", ed. Aronson & Folk, Pergamon, 1966).

Las especulaciones relativas a la naturaleza del defecto metabólico de esta enfermedad han incluido anomalías en el metabolismo de los hidratos de carbono, sobreproducción de cerebrósidos y deficiencias en el catabolismo de cerebrósidos. Las dos primeras alternativas no pudieron sostenerse al establecerse la perfecta normalidad en el metabolismo de los hidratos de carbono y la biosíntesis de cerebrósidos en pacientes con enfermedad de Gaucher (M. Philippart, B. Rosenstein y J. H. Menkes, *J. Neuropath. Exper. Neurol.*, 24, 290, 1965).

La deficiencia quedó, pues, centrada en el catabolismo de cerebrósidos y ello ha adquirido plena confirmación con el empleo de gluco-cerebrósidos con la glucosa isotópicamente marcada y poder observarse la existencia en cerebro, hígado, bazo, riñón e intestinos de una enzima que cataliza la hidrólisis de los cerebrósidos con formación de glucosa y ceramida. Los niveles de gluco-cerebrósidas se han determinado en bazo de pacientes con distintas formas clínicas de esta enfermedad, y ha podido establecerse la ausencia casi completa en las formas infantiles y tan sólo una mínima actividad residual en las preparaciones de las formas adultas.

Recientemente se han descrito casos de enfermedad de Gaucher en las que no se han podido detectar acumulaciones anormales de cerebrósidos en cerebro.

**FABRY.** La enfermedad de Fabry asocia la acumulación en numerosas células y tejidos de ceramida-dihexosido y ceramida-trihexosido. La deficiencia enzimática tiene lugar a nivel de la ceramida-trihexosido- $\beta$ -galactosidasa, y se transmite de modo recesivo ligada al sexo.

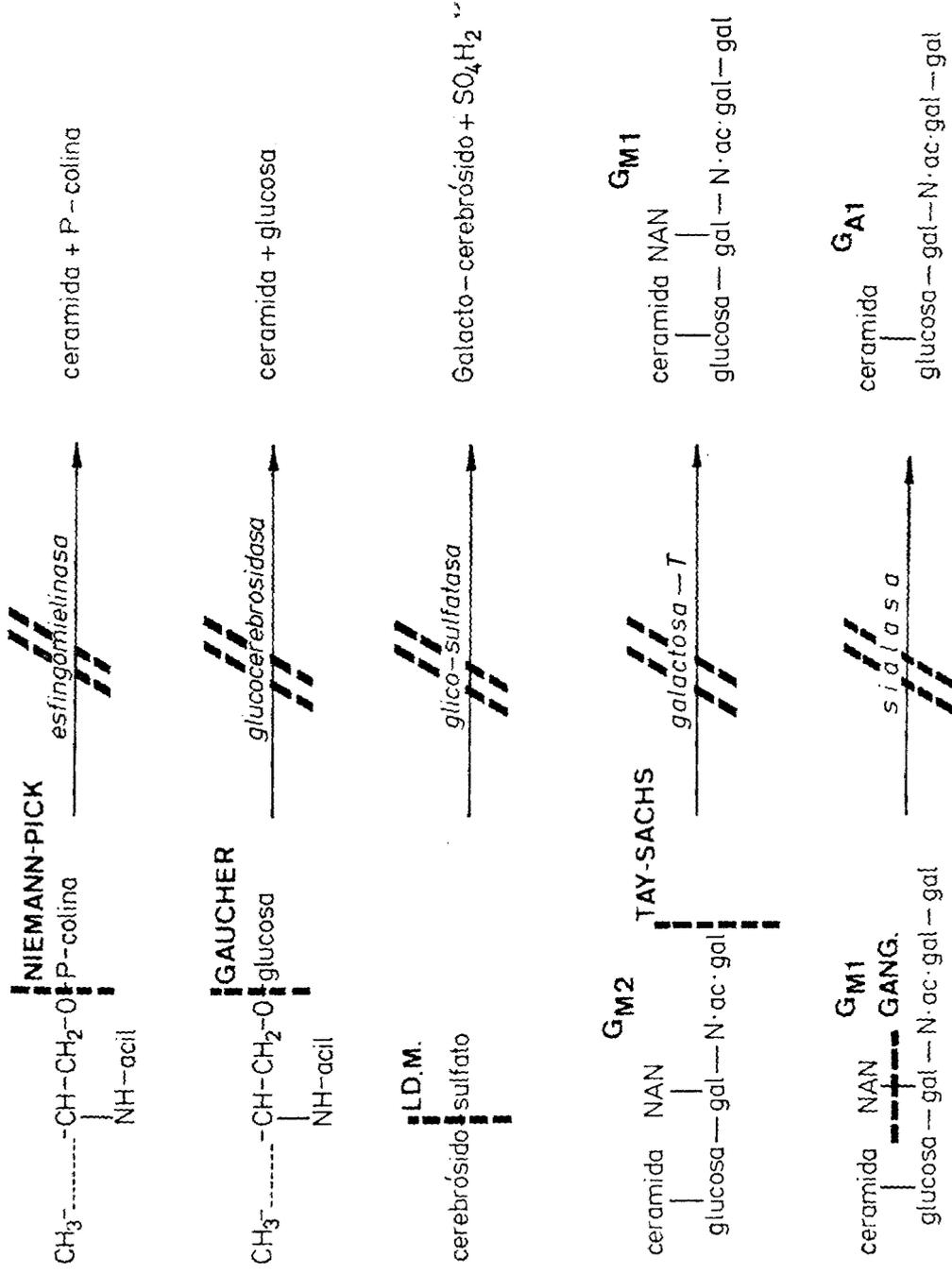
**LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA.** Afecta de modo principal al sistema nervioso central, y en ella se presentan anomalías en el metabolismo de los cerebrósido-sulfatos, que se traducen en una acumulación excesiva de sulfátidos en varios tejidos, principalmente cerebro y riñón.

En condiciones normales, estos sulfátidos se escinden de modo enzimático por acción de las sulfatasas, dando lugar a los cerebrósidos —con una sola molécula de hexosa— que, a su vez, son sustratos para la elaboración biosintética de gangliósidos que resulta también lógicamente afectada si los niveles de cerebrósidos disminuyen en concomitancia con la elevación de sulfátidos. Esta concomitante disminución de cerebrósidos y aumento de los sulfátidos tiene como causa —y ello es la lesión metabólica de esta condición— una disminución de la actividad de la sulfúrico-esterasa o sulfatasa, tanto en orina como en órganos. De los tres tipos de aril-sulfatasas, A, B, y C, descritas, la sulfatasa A es la enzima que normalmente cataliza la hidrólisis de los cerebrósido-sulfatos, la detección de cuya deficiencia en condiciones perfectamente controladas es de notable interés diagnóstico (M. Burstone, "Enzyme Histochemistry", *Acad. Press. N. Y.* 1962; L. Nichol y A. Roy, *J. Biochem.*, 55, 643, 1964; E. Mehl y H. Jatzkewitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 407, 1965).

En el grupo general de Leucodistrofias se incluye la esclerosis difusa infantil de KRABBE, en la que todas las clases de lípidos se encuentran disminuidos en el tejido cerebral, y cuya localización bioquímica permanece prácticamente desconocida.

**IDIOCIA AMAURÓTICA FAMILIAR.** Es un grupo de anomalías que comprende diversas formas, entre las que figura, como mejor estudiada, la forma infantil o enfermedad de TAY-SACHS. En esta anomalía aparece profundamente alterada la distribución de los gangliósidos y el cambio fundamental se centra en el incremento notable de la ceramida-monosialo-trihexósido ( $G_M$ ), denominado también gangliósido TAY-SACHS, que responde a más del 90 por 100 de los gangliósidos totales; en menor grado aumentan asimismo los dihexósidos, tanto monosialo como disialo, este último ausente casi del tejido normal (L. Svennerholm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 436, 1962; A. Wagner, J. A. Dain y G. Schmidt, *Fed. Proc.*, 22, 334, 1963; J. N. Kanfer, R. S. Blacklow, L. Warren y R. O. Brady, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 287, 1964; S. Basu, B. Kaufmann y S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, 240, 4115, 1965).

Estos datos analíticos tienen como fundamento la incapacidad del ganglió-



sido TAY-SACHS a la incorporación en la ruta biosintética que viene catalizada por la galactosa-transferasa.

La frecuencia de esta enfermedad en familias judías oscila alrededor de 1:5.000; la detección de heterocigotes es, pues, un grave problema, ya que es la única manera de prevenir la enfermedad. En este sentido se ha descrito la ausencia en los portadores de fructosa-1-P aldolasa.

En el seno de este mismo grupo de estados patológicos se conoce la forma infantil tardía de BIELSCHOWSKY, la GANGLIOSIDOSIS GENERALIZADA y las enfermedades de NORMAN, de BATTEN-MAYOU-SPIELMEYER-VOGT y de KUFES.

En los casos descritos con anterioridad se presentan acumulaciones netas y claras de estos lípidos complejos por encima de su nivel normal. Sin embargo, la acumulación puede presentarse enmascarada como consecuencia de la destrucción más o menos parcial de los tejidos en que estos compuestos se localizan. La existencia, entonces, de una discrepancia entre datos histológicos y bioquímicos podrá ser una expresión indirecta de la existencia de un desorden metabólico, origen de la acumulación enmascarada de una sustancia (G. W. F. Edgar, Proc. V Int. Cong. Neuropathology, pág. 350 (1966), *Excerpta Med.*, Amsterdam). Y ello obliga a un estudio cuantitativo más completo y delicado que ponga de manifiesto la desproporción. Esto es lo que ocurre en la forma infantil tardía de Bielschowsky. En ella existe una marcada destrucción de células ganglionares y de mielina, al lado de la cual se presenta sólo una ligera depresión de lípidos con hexosamina por un lado y de esfingomielina por otro. La consecuencia es una acumulación enmascarada de ambas clases de lípidos que hay que poner claramente de manifiesto. Para ello se ha utilizado la relación esfingomielina/galactosa; esta relación se eleva de modo notable en la forma de Bielschowsky y tiende a disminuir en las condiciones desmielinizantes no metabólicas.

En la GANGLIOSIDOSIS GENERALIZADA (J. S. O'Brien, *Am. J. Dis. Child*, 109, 338, 1965), el nivel total de gangliósidos es muy elevado y la especie que se acumula en los histiocitos de hígado, bazo y otros órganos es el monosialo-gangliósido ( $G_{M1}$ ) con cuatro restos de hexosa que es el más abundante del cerebro. Parece probable que el defecto enzimático radique en la etapa inicial del catabolismo de este gangliósido: bien por hidrólisis de la galactosa terminal (para dar  $G_{M2}$ ) o bien de modo alternativo por hidrólisis del NAN (para dar  $G_{A1}$ ). El hecho de que también se acumulen los otros monosialo-gangliósidos ( $G_{M2}$  y  $G_{M3}$ ) hace lógico pensar en la segunda hipótesis, es decir, en una deficiencia de  $\beta$ -galactosidasa en diversos tejidos (S. Okada y J. S. O'Brien, *Science*, 160, 1002, 1968).

Una relación muy estrecha con dos de los anteriores estados patológicos,

Leucodistrofia metacromática y Gangliosidosis generalizada, guarda un conjunto de variantes patológicas conocidas como GARGOILISMO. Con la leucodistrofia metacromática en cuanto que en el gargoilismo se presenta de modo característico una acumulación de esteres sulfúricos y con la gangliosidosis generalizada en cuanto a sus analogías clínicas, hasta tal punto que algunos autores consideran a esta última anomalía como un grupo separado de gargoilismo (B. S. Danes y A. G. Bearn, *Science*, 149, 987, 1965; *J. Exptl. Med.*, 123, 1, 1966 y 124, 1181, 1966).

Los síntomas clínicos se consideran bajo dos formas principales, los síndromes denominados de HURLER y HUNTER; el primero identificable en los primeros días del nacimiento y el segundo alrededor de los dos años y ambos con diferente evolución.

El síndrome de HURLER transmite genéticamente una anomalía en el metabolismo de mucopolisacáridos, químicamente distinguible por una excesiva acumulación intracelular y eliminación urinaria de condroitin-sulfato B y heparitin-sulfato; análogos productos se acumulan en el síndrome de HUNTER, por otro lado clínicamente menos severo y desde el punto de vista genético transmisible ligado al sexo.

Si bien estas anomalías tienen su fundamento bioquímico (J. C. Fratantoni, C. W. Hall y E. F. Neufeld, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 60, 699, 1968) en la acumulación de polisacáridos como consecuencia de una deficiencia en su degradación, se presentan también alteraciones en los niveles de gangliósidos cerebrales, esencialmente elevación de los monosialogangliósidos (D. A. Booth, K. Goodwin y J. N. Cumings, *J. Lipid Res.*, 7, 337, 1966). Alteraciones, pues, que si no pueden considerarse en el estado actual de los conocimientos como encuadrables en el seno de las esfingolipidosis por cuanto a la naturaleza de la anomalía bioquímica cuantitativamente de mayor importancia, necesitan de esclarecimientos más precisos para definir las relaciones gangliósidos-mucopolisacáridos o para el establecimiento de errores metabólicos mixtos. A ello está contribuyendo la utilización de técnicas de cultivo de fibroblastos de la piel que puede distinguir la existencia de fenotipos anormales en las células de los antecesores. En la piel e hígado se ha señalado una disminución en la actividad de la  $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa (P. A. Ockerman y P. Köhlin, *Acta Pediat. Scan.*, 57, 281, 1968).

A la vista de estas alteraciones genéticas del metabolismo de los lípidos y ante la grave cuestión de las posibilidades de tratamiento, debe mencionarse la existencia de *métodos terapéuticos generales para restaurar las condiciones bioquímicas normales*; ellos han de consistir en restablecer el fenotipo normal por restricción de sustratos acumulables, suministro de productos finales deficitarios, suplementación de cofactores cuya carencia impide la normal realiza-

ción de reacciones enzimáticas, administración de enzimas exógenas y medidas terapéuticas secundarias.

En el terreno de las lipodosis hereditarias, la restricción de sustratos acumulables —por ejemplo, de ácido fitánico en la enfermedad de Refsum— es la única posibilidad de fácil tratamiento.

Los futuros avances en la administración de enzimas exógenas habrán de estar sujetos a la problemática de su accesibilidad a las localizaciones de su acción y a la dificultad en el avance técnico que permita su disponibilidad.

Por lo que se refiere a las posibilidades de obtención sintética de proteínas, un gran impulso ha tenido lugar en los últimos años con la síntesis peptídica en fase sólida (R. B. Merrifield, *Science*, 150, 178, 1965) y los avances de su automatismo; limitado ello, como es natural, por el requisito esencial de la previa averiguación de la estructura primaria, asimismo en progreso notable con el empleo de los secuenciadores automáticos (P. Edman y G. Begg, *European J. Biochem.*, 1, 80, 1967).

Las fuentes naturales de proteínas, aparte de las exigencias de especificidad de especie, ofrecen hoy varios aspectos de interés; uno de ellos se centra en el empleo de cultivos de tejidos como fuente de enzimas funcionales; otro, el trasplante más o menos parcial de órganos como vía de suministro de enzimas carenciales y, en tercer lugar, la utilización de una terapéutica enzimática extracorpórea. Técnica esta última que va a permitir paliar la dificultad de las diferencias inmunogenéticas entre el organismo receptor y el donador enzimático (G. H. Hitchings, *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.*, 13, 15, 1968).

A pesar de la trascendencia de las anteriores alteraciones genéticas, de todas las manifestaciones patológicas que se fundamentan o relacionan íntimamente con el metabolismo lipídico, son las enfermedades arteriales, y en particular la ATROSCLEROSIS DE LAS ARTERIAS CORONARIAS, las que adquieren una más trágica vigencia en los países occidentales; duro impuesto a su variada, rica y lujosa alimentación.

En la definición que la Organización Mundial de la Salud hace del concepto de aterosclerosis se concluye la existencia de una "serie de alteraciones variables en la íntima de las arterias". Estas alteraciones vienen gobernadas por una serie de factores que conducen a ciertos tipos de acumulaciones, lípidos, hidratos de carbono complejos, calcio, etc.; la naturaleza de estas sustancias, la dinámica vascular, diferencias de especie y genéticas, etc. son factores capaces de influenciar el metabolismo arterial.

Casi todas las especies animales, desde los peces a los primates, son capaces de exhibir un cierto grado de incidencia de aterosclerosis (J. C. Roberts y R. Straus, "Comparative Atherosclerosis", Hoeber, New York, 1965); muchas veces las lesiones ateroscleróticas implican cambios tan ligeros que no inter-

fieren con el aporte sanguíneo a los órganos y tejidos y no se traducen en enfermedades orgánicas, pero el estado patológico abarca a las condiciones más diversas bajo las que viven las distintas especies animales con la única condición de poseer un sistema arterial.

La identificación en el hombre de esquemas metabólicos capaces de conducir a estados ateroscleróticos viene buscándose con ahínco, investigándose en poblaciones humanas donde la naturaleza o la historia han originado especiales condiciones a su existencia, relacionando en animales de experimentación la patología vascular con la bioquímica de los lípidos e incluso a través de la permanencia o variación de dichos esquemas en la escala filogenética y que si alguna vez tuvieron algún valor en las condiciones de supervivencia, en nuestra civilización y en nuestro tiempo, en nuestra forma actual de vida pueden conducir a la enfermedad y a la muerte (L. E. Hinkle, *Social Sci. Med.*, 1, 129, 1967).

Veamos, en un principio, lo que en este sentido nos muestra la evolución zoológica (H. H. Hecht y D. K. Detweiler, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 127, 1, 1965). La aterosclerosis aórtica es tan frecuente en el hombre como en muchas especies animales, en tanto que la forma coronaria es notoriamente más rara, pero que la pueden presentar aves silvestres e incluso existen datos epidemiológicos de infarto de miocardio en ciertas aves durante la crianza. Los primates avanzados, gorila y chimpancé, con el mismo tipo de arterias coronarias que el hombre, presentan anomalías patológicas antes de la pubertad.

Este ejemplo de experimentación zoológica en aves y mamíferos va a poner de manifiesto que las alteraciones arteriales y miocárdicas son reflejo de un conjunto de circunstancias fisiológicas y psicológicas producidas por estímulos sociales más que por efecto de la edad en sí misma (G. Björck, *Circulation*, 37, 1071, 1968).

Ya estos antecedentes fuerzan a presuponer una multiplicidad causal de la aterosclerosis humana y a justificar la controversia actual sobre su patogénesis. Mas ante la preeminencia de cualquier hipótesis, los factores dietéticos ocupan una posición de privilegio en la etiología del ateroma.

Los cambios bioquímicos que tienen lugar en las arterias normales y patológicas constituyen el fundamento de una interpretación molecular de la aterogénesis. Las anomalías metabólicas de la íntima de los vasos sanguíneos, estudiadas mediante técnicas bioquímicas y de cultivos de órganos, reciben en estos momentos una especial dedicación.

En el conjunto de esta compleja problemática, la relación entre patogénesis de ateromas y metabolismo de lípidos viene sustanciada por las siguientes consideraciones:

1. Las primeras lesiones en las arterias ateromatosas coinciden con la acu-

mulación de lípidos en las células de la íntima y en los engrosamientos de la subíntima, estando el colesterol presente de modo invariable en las lesiones claramente establecidas.

2. La incidencia de aterosclerosis es elevada en pacientes con metabolismo anormal de lípidos y en particular coincidente con elevados niveles de colesterol en sangre.
3. La evidencia clínica de la aterosclerosis exhibe como dato analítico definitorio niveles plasmáticos anormales de lípidos.
4. En el desarrollo de la lesión, las capas de íntima y subíntima engrosan fuertemente, debido a la acumulación lipídica con alteración de la morfología celular.

La consideración simplemente analítica de los niveles de ciertos lípidos, colesterol y triglicéridos fundamentalmente, ofrecen como aspecto más fundado de controversia la falta de información rigurosa que suministran acerca de la síntesis, transporte y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas, cuyas alteraciones bioquímicas sirven de base a la tipificación de las hiperlipemias y cuyas relaciones con los procesos aterogénicos van siendo cada vez más definidas.

A pesar de la importancia de la relación de los niveles de lípidos en plasma con el desarrollo de enfermedades coronarias, la información no es suficiente en cuanto a la relación con factores genéticos y ambientales. Diferencias dietéticas y ecológicas pueden explicar con facilidad las divergencias que exhiben los individuos a ellas sometidos; sin embargo, en grupos homogéneos de poblaciones, las diferencias hay que buscarlas (S. Deutscher, F. H. Epstein y M. O. Kjelsberg, *Circulation*, 33, 911, 1966) en factores constitutivos y ambientales. En una primera averiguación de estas relaciones (W. R. Harlan, A. Oberman, R. E. Mitchell y A. Graybiel, *Ann. Int. Med.*, 66, 540, 1967), la fracción  $S_f$  0-12 de lipoproteínas se correlaciona con la obesidad constitutiva y antecedentes familiares de enfermedades vasculares; las fracciones  $S_f$  20-100 y  $S_f$  100-400 se relacionan con obesidad adquirida.

En 1952 se describen asociaciones de la aterosclerosis experimental con hipercolesteremia (R. W. Wissler, M. L. Eilert, M. A. Schroeder y L. Cohen, *Arch. Path.*, 57, 333, 1954; W. S. Hartroft, J. M. Ridout, E. M. Sellers y C. M. Best, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 81, 384, 1952); posteriormente se logra asimismo la producción experimental de trombosis y de infarto de miocardio por desbalances dietéticos (G. F. Wilgram, *J. exp. Med.*, 109, 293, 1959; W. A. Tho-

mas y W. S. Hartroft, *Circulation*, 19, 65, 1959; S. Renaud, *J. Atheroscler. Res.*, 5, 43, 1965).

La probabilidad de desarrollo de enfermedades coronarias se encuentra claramente relacionada con los niveles de lípidos y lipoproteínas sin que se pueda definir por completo la proporción relativa de las distintas fracciones lipídicas (D. F. Brown, S. H. Kinch y J. T. Doyle, *New Eng. J. Med.*, 273, 947, 1965); parece ser, sin embargo, que tanto las  $\beta$ -lipoproteínas ricas en colesterol,  $S_f$  0-12, y las pre- $\beta$ -lipoproteínas ricas en triglicéridos,  $S_f$  20-400, contribuyen independientemente a la implantación de los síndromes coronarios (W. P. Castelli, W. B. Kannel y D. Shurtleff, *Circulation*, 34, 71, 1966).

Otros factores cuya participación puede estar independientemente relacionada con este proceso —obesidad, somatotipo, tolerancia a hidratos de carbono, uso de tabaco, etc.— tienen importancia por su influencia sobre los niveles de lípidos en suero. La evaluación de estos factores y su participación directa o indirecta en la aterogénesis es de gran importancia práctica, ya que incluso una terapéutica efectiva en la disminución de los lípidos en sangre sin alterar otros factores específicos no suministrará protección frente a las enfermedades coronarias a no ser que exista una relación directa de éstas con los niveles lipídicos.

*Establecidas, pues, la alteración de los niveles de lípidos plasmáticos y la alteración de la participación de los lípidos en la pared arterial, como condiciones generales de la aterogénesis, veamos en qué forma se traduce la anormalidad tanto por lo que se refiere a la composición como al metabolismo lipídico de las arterias.*

Ya en 1843 fue conocida la abundante presencia de colesterol en las arterias ateromatosas (H. Dam, en "Historical introduction", de la obra *Cholesterol*, Ed. R. P. Cook, pág. 2. Acad. Press, N. Y. 1958).

En 1910, Windaus (A. Windaus, *Z. Physiol. Chem.*, 67, 174, 1910) demuestra que la aorta ateromatosa contiene 6 a 7 veces más colesterol libre y unas 20 veces más colesterol esterificado que la aorta normal.

Toda una serie de experiencias (D. R. Meeker y J. W. Jobling, *Arch. Path.*, 18, 252, 1934; R. C. Buck y R. J. Rossiter, *Arch. Path.*, 51, 224, 1951; C. J. F. Böttcher, J. G. Keppler, C. C. Ter Haar, E. Boelsma y C. M. van Gent, *Lancet*, 1207, 1958; C. J. F. Böttcher, F. P. Woodford, C. C. Ter Haar, E. Boelsma y C. M. van Gent, *Lancet*, 1378, 1960; F. E. Luddy, R. A. Barford, R. W. Riemenschneider y J. D. Evans, *J. Biol. Chem.*, 232, 843, 1958; E. B. Smith, *Lancet*, 799, 1960; E. B. Smith, *J. Atheroscler. Res.*, 5, 224, 1965) coinciden en definir un aumento de lípidos totales en las lesiones ateroscleróticas cuyo acentuamiento va acompañado de un enriquecimiento progresivo en glicéridos, fosfátidos —sobre todo esfingomielinas— colesterol libre y esterificado (C. J. F. Böt-

tcher, *Proc. Roy. Soc. Med.*, 57, 792, 1964). La acumulación de triglicéridos en la pared arterial aterosclerótica no es tan acusada como la de colesterol (W. Insull y G. E. Bartsch, *J. Clin. Invest.*, 45, 513, 1966) quizá por la notable participación en este tejido de reacciones enzimáticas degradativas; entre ellas, una acción lipásica particularmente importante en las especies que ofrecen mayor resistencia al desarrollo de la aterosclerosis experimental.

Los fosfolípidos que se acumulan en las lesiones ateroscleróticas son más bien resultado de una biosíntesis local en la pared que de su filtración desde la sangre. La incorporación de  $^{32}\text{P}$  en los fosfolípidos de la aorta varía con la especie animal y difiere de la que tiene lugar en las arterias coronarias, sobre todo en lecitinas y fosfatidil-inositol. (M. Nakatani, T. Sasaki, T. Miyazaki y M. Nakamura, *J. Atheroscler. Res.*, 7, 747, 1967; 7, 759, 1967).

En este sentido, es de importancia establecer el hecho que el colesterol libre y sus esteres mono no-saturados son altamente esclerogénicos, en tanto que los esteres poli no-saturados son más fácilmente movilizados desde los tejidos y exhiben un efecto irritante relativamente pequeño sobre los tejidos conectivos. Los triglicéridos exhiben poca actividad esclerogénica cuando se implantan en los tejidos (Y. H. Abdulla, C. W. M. Adams y R. S. Morgan, *J. Path. Bact.*, 19678); ello, unido a su escasa acumulación en las lesiones ateroscleróticas, sugiere que los triglicéridos no posean especial significado como agentes aterogénicos. Sin embargo, los triglicéridos saturados y mono no-saturados son capaces de promover la agregación de las plaquetas y la trombosis experimental. Otras sustancias liposolubles, cuya biosíntesis no puede realizarse por el organismo humano como ácido linoleico o carotenoides, se encuentran en las placas ateromatosas, demostración evidente de su origen exógeno.

No obstante, la situación real de los niveles y naturaleza de los lípidos acumulados en las lesiones ateroscleróticas aparece complicada por la diversidad de éstas en razón a sus características histológicas. Se han descrito tres tipos diferentes: lesiones grasas, lesiones fibrosas y placas mixtas. Las lesiones grasas contienen un gran número de células llenas de microgotas lipídicas que dan lugar en lesiones avanzadas a zonas denominadas de lípidos amorfos. Las lesiones fibrosas en sus primeras etapas consisten en engrosamientos de tipo colágeno, sin células poseedoras de grasa, y que en su progreso pueden presentar zonas de lípidos amorfos en las grandes placas fibrosas. Las placas mixtas constan de un núcleo central de lípidos amorfos y una gruesa cubierta de colágeno.

Estas placas, grasas y fibrosas, tienen un origen diferente basado en datos químicos (E. B. Smith, *J. Atheroscler. Res.*, 5, 224, 1965) y topográficos (C. J. Schwartz y J. R. A. Mitchell, *Circulation Res.*, 11, 63, 1962), poseyendo a su vez distintos niveles y clases de lípidos en todos los estados de su desarrollo.

En las LESIONES GRASAS ocurre un aumento progresivo del colesterol libre

y un cambio progresivo asimismo en la composición de los ácidos grasos que lo esterifican; cuando estas lesiones no poseen aún lípidos amorfos, contienen 53 por ciento de ácido oléico y 13 por ciento de linoléico. En las LESIONES FIBROSAS no es significativo el incremento de colesterol libre asociado con la aparición de lípidos amorfos, aunque subsisten las variaciones en los ácidos grasos de sus esteres; en estas lesiones sin lípidos amorfos existen niveles de 25 por ciento de ácido oléico y 43 por ciento de ácido linoléico. En ambos tipos de lesiones existe una correlación elevada entre colesterol libre y composición de ácidos grasos; en cada tipo de lesión, el porcentaje del ácido graso que está presente en mayor concentración disminuye al aumentar el colesterol libre, oléico en las lesiones grasas y linoléico en las fibrosas, lo que sugiere una hidrólisis enzimática de los esteres de colesterol. Con frecuencia el solapamiento de lípidos amorfos y lípidos perifibrosos normales ocasiona anomalías en los resultados analíticos obtenidos en las placas fibrosas (E. B. Smith, R. S. Slater y P. K. Chu, *J. Atheroscler. Res.*, 8, 399, 1968).

*Ponen de manifiesto, pues, todos estos resultados cómo la composición en ácidos grasos de los esteres de colesterol es completamente diferente según la naturaleza de las lesiones y subrayan la dificultad de generalización de los datos en cuanto a niveles lipídicos se refiere.*

En cuanto a la relación fosfolípidos-colesterol, en las placas grasas no hay variación apreciable con la evolución de las mismas; sin embargo, en las placas fibrosas los lípidos amorfos van asociados con un incremento significativo en la proporción colesterol-fosfolípidos.

Del conjunto de lípidos de la aorta aterosclerótica hay una fracción que no es extraíble por los métodos ordinarios (C. J. F. Böttcher, F. P. Woodford, E. Boelsma y C. M. van Gent, *Rec. Trav. Chim.*, 78, 794, 1959) y sólo puede llevarse a cabo después de una hidrólisis ácida o tratamientos con elastasa o pepsina (C. W. M. Adams y O. B. Bayliss, *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 222, 1962). La constitución de estos lípidos unidos parece ser compleja (T. H. Joh, K. Fuzakawa, F. A. Kummerow y E. G. Perkins, *J. Atheroscler. Res.*, 6, 164, 1966) a base de esteroides esterificados, colesterol libre, mono-, di- y tri-glicéridos y un material de naturaleza no determinada. La naturaleza de los ácidos grasos existentes en estos lípidos unidos es altamente compleja, con predominio importante de ácido esteárico y desconocidos algunos de ellos (H. Warembourg, G. Biserte, J. Jaillard, G. Sezille, M. Bertrand y P. Scherpereel, *J. Atheroscler. Res.*, 7, 601, 1967). Estos lípidos se encuentran unidos a las proteínas de un modo particular, distinto de las uniones que intervienen en las lipoproteínas (fuerzas iónicas, fuerzas polares tipo Van der Waals), posiblemente a base de uniones covalentes entre grupos fosfóricos de fosfolípidos y grupos  $-NH_2$  de aminoácidos. Puede tratarse de fosfolípidos fuertemente no saturados (V. Mag-

gi, J. Chayen, P. B. Gahan y W. Brander, *Exp. Mol. Pathol.*, 3, 413, 1964) o lípidos oxidados (K. Oette, *J. Lipid Res.*, 6, 449, 1965).

La importancia fisiológica y el papel patogénico eventual de los lípidos unidos y de sus alteraciones en la génesis de la aterosclerosis permanece aún sin precisar.

Desde los tiempos de Virchow, el origen de los lípidos en las lesiones ateroscleróticas ha sido objeto de múltiples especulaciones e hipótesis. La naturaleza de esta acumulación no puede explicarse por simples fenómenos de filtración y deposición de los lípidos del plasma, y, ante ello, no hay sino postular que la pared arterial es capaz de metabolizar y sintetizar estos constituyentes.

Debe quedar constancia, no obstante, que los lípidos plasmáticos, incluidas las lipoproteínas, son capaces de penetrar la pared arterial. Utilizando técnicas de anticuerpos fluorescentes se ha demostrado la presencia en las lesiones ateromatosas de lipoproteínas de baja densidad, en tanto que es escaso el nivel presente de las lipoproteínas de elevada densidad (V. C. Kao y R. W. Wissler, *Exp. Mol. Path.*, 4, 465, 1965).

Dos aspectos fundamentales exigen especial consideración en el conjunto del metabolismo lipídico de las arterias: su capacidad para biosintetizar lípidos, colesterol incluido, y la proporción relativa de éste, obtenido "in situ", al de procedencia exógena.

El colesterol se biosintetiza por la pared arterial, tanto normal como aterosclerótica (D. D. Feller y R. L. Huff, *Am. J. Physiol.*, 182, 237, 1955; M. D. Siperstein, I. L. Chaikoff y S. S. Chernik, *Science*, 113, 747, 1951), aunque la mayor parte del colesterol que se acumula en las paredes procede del plasma (H. A. I. Newman, E. L. McCandless y D. B. Zilversmit, *J. Biol. Chem.*, 236, 1.264, 1961). La experimentación es concluyente. La administración de colesterol isotópicamente marcado a conejos normales e hipercolesterémicos (M. W. Biggs y D. Kritchevsky, *Circulation*, 4, 1.732, 1962; W. E. Connor y C. S. Jackson, *Circulation*, 28, Pt2, 653, 1963), seguida de un riguroso control isotópico en suero y tejidos, pudo demostrar que el colesterol exógeno constituye la mayor parte del colesterol presente en los depósitos ateromatosos, si bien la síntesis endógena prosigue aun en presencia de cantidades masivas de colesterol administradas por vía oral.

La determinación de la capacidad de biosíntesis de colesterol por las arterias exhibe discrepancias. Ya en 1958 (D. L. Azarnoff, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 98, 680, 1958) se señala una diferenciación manifiesta entre las especies con capacidad o con imposibilidad de biosíntesis de colesterol; pueden biosintetizar colesterol conejos, pollos y cobayas, y no pueden hacerlo perros, ratas y humanos. Estos resultados han sido, sin embargo, modificados en el sentido

de la posibilidad de biosíntesis por la aorta de rata a partir de acetato (D. W. Foster y M. D. Siperstein, *Am. J. Physiol.*, 198, 25, 1960; S. Dayton, S. Hashimoto y J. Jessamy, *J. Atheroscler. Res.*, 1, 444, 1961) y la imposibilidad, asimismo, de biosíntesis arterial de colesterol por parte del conejo ante la incorporación de acético o mevalónico (A. F. Whereat, *J. Atheroscler. Res.*, 4, 272, 1964).

Más recientes estudios de perfusión de aortas (H. B. Lofland y T. B. Clarkson, *Arch. Pathol.*, 80, 291, 1965; H. B. Lofland, D. M. Moury, C. W. Hoffman y T. B. Clarkson, *J. Lipid Res.*, 6, 112, 1965; R. W. St. Clair, *Fed. Proc.*, 26, 372, 1967) han servido para medir la incorporación de acético y mevalónico en colesterol libre y esterificado tanto en individuos normales como ateroscleróticos y para confirmar en el hombre la práctica ausencia de biosíntesis aórtica de colesterol. Su presencia en las lesiones ateroscleróticas habrá de tener, pues, un origen plasmático; siempre cabe, sin embargo, tener presente la restricción conceptual que supone la extrapolación de estos hechos a las condiciones "in vivo", sobre todo en lo que se refiere al tiempo necesario para el desarrollo de las lesiones (A. F. Whereat, *Exp. Mol. Pathol.*, 7, 233, 1967).

Mediante las mencionadas técnicas de perfusión aórtica se ha podido correlacionar la severidad de la enfermedad tanto en el hombre como en conejo y pichón con el aislamiento cromatográfico de un producto reconocido en principio como escualeno, cuya formación resulta acelerada por la administración de colesterol en la dieta, pero que no puede ulteriormente dar lugar en la aorta a su transformación en colesterol.

Se ha sugerido que el intercambio metabólico del colesterol con la pared arterial viene influido activamente por factores en ella presentes (H. A. I. Newman y D. B. Zilversmit, *J. Biol. Chem.*, 237, 2.078, 1962; *Circulation Res.*, 18 293, 1966). Ello no ocurre en el caso de los ésteres de colesterol; en ellos, los ácidos grasos integrantes son distintos según su procedencia de placas ateroscleróticas o de íntima normal, con un contenido relativo oleico/linoleico superior en el estado patológico (J. C. Geer y M. Guidry, *Exptl. Mol. Pathol.*, 3, 485, 1964). Los ésteres de colesterol que filtran del plasma son sustratos de hidrólisis y reesterificación ulterior en la pared arterial (H. B. Lofland, D. M. Moury, C. W. Hoffman y T. B. Clarkson, *J. Lipid Res.*, 6, 112, 1965; A. J. Day y P. R. S. Gould-Hurst, *Biochim. Biophys. Acta*, 116, 169, 1966).

La imposibilidad de degradación del colesterol por los tejidos animales, a diferencia de otros lípidos, obliga a la consideración de un balance a base de su ingreso en el conjunto plasma-tejidos y de su eliminación; el colesterol permanece almacenado en el tejido o lo abandona. Principio éste de aplicación válida, tanto al organismo en su totalidad como a cualquier tipo de tejido, incluyendo la pared arterial. La acumulación de colesterol procede de la dieta

y de la síntesis por hígado e intestino de modo preferente. La eliminación es fecal, como tal o bajo la forma de ácidos biliares.

La pared arterial puede esterificar activamente el colesterol con ácidos grasos poli-no saturados, de modo que el colesterol libre se dispersa y se hace inocuo. Recientemente se ha detectado una colesterol-lecitina ácido graso transferasa en el tejido arterial, si bien no está definida aún su importancia fisiológica. La concomitancia de elevación del colesterol con la de los fosfolípidos en tejidos o plasma puede representar para la biosíntesis arterial endógena de fosfolípidos la presencia de un donador de ácidos grasos poli-no saturados para la reacción de transacilación, anteriormente mencionada.

La actividad metabólica de la aorta en orden a la biosíntesis de fosfolípidos se ha puesto de manifiesto en experiencias de incubación y perfusión con  $\text{Na}^{32}\text{PO}_4$ , concluyéndose, de modo simultáneo, una mayor actividad específica en fosfatidil-etanolamina que en fosfatidil-colina. Y la misma concomitancia que en la elevación de colesterol y fosfolípidos ha quedado señalada hace unos momentos, se presenta ahora al observar una superior síntesis aórtica de fosfolípidos en animales hipercolesterémicos (J. D. Billimoria y T. J. Rothwell, *Progr. Biochem. Pharmacol.*, 4, 225, 1968).

Puede asimismo la pared arterial biosintetizar ácidos grasos en un proceso fundamentalmente mitocondrial, que se intensifica en los procesos ateroscleróticos experimentales inducidos por el colesterol (A. F. Whereat, *J. Atheroscler. Res.*, 4, 272, 1964). La distribución en este caso de los ácidos grasos nuevamente sintetizados en la aorta presenta diferencias con relación a la distribución normal. La diferencia más importante estriba en su presencia destacada bajo la forma de ésteres de colesterol y menor en fosfolípidos; relación opuesta a la exhibida en las aortas normales (D. W. Foster y M. D. Siperstein, *Amer. J. Physiol.*, 198, 25, 1960).

La destacada naturaleza mitocondrial (A. F. Whereat, *J. Lipid Res.*, 7, 671, 1966) de la biosíntesis aórtica y cardíaca (E. J. Christ y W. C. Hülsman, *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 72, 1962) de ácidos grasos queda destacada al ser los ácidos grasos libres de mitocondrias de aortas normales, responsables del 42 por 100 del total de su contenido en ácidos grasos. La biosíntesis de los ácidos grasos mitocondriales responden a un mecanismo de elongación de la cadena sin participación del proceso citoplasmático a base de malonil-Co A; los ácidos grasos de más de 18C representan el 80 por 100 del total.

Las mitocondrias de tejido aórtico aterosclerótico inducido por dietas hipercolesterémicas son capaces de incorporar acetato unas cuatro veces más eficientemente que las del tejido normal, hecho que no se produce por la simple presencia de colesterol.

La regulación de la biosíntesis mitocondrial de ácidos grasos viene contro-

lada por la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (A. F. Whereat, *J. Biol. Chem.*, 242, 4013, 1967) y, por ello, el ácido succínico, que ocasiona una reducción de NAD<sup>+</sup>, es el único eslabón del ciclo cítrico capaz de estimular el proceso de síntesis.

Al lado de este estímulo de la síntesis de ácidos grasos en las aortas ateroscleróticas se produce, asimismo, una mayor formación "in vivo" de fosfolípidos a partir de <sup>32</sup>P, acetato-<sup>14</sup>C y glucosa-<sup>14</sup>C (H. A. I. Newman, E. L. McCandless y D. B. Zilversmit, *J. Biol. Chem.*, 236, 1.264, 1961; F. Parker, J. W. Ormsby, N. F. Peterson, G. F. Odland y R. H. Williams, *Circulation Res.*, 19, 700, 1966).

*El conjunto de estudios acerca del defecto bioquímico básico en la aterosclerosis sugiere la existencia de un desacoplamiento de la oxidación del NADH en la cadena respiratoria, cuyo incremento estimula la síntesis mitocondrial de los ácidos grasos en los tejidos vasculares.*

*Este desequilibrio puede producirse también por lo que se refiere a los agentes nutritivos que el organismo ofrezca a las mitocondrias de las células del músculo liso, y de esta manera no hay inconveniente en vislumbrar una conexión de los síndromes patológicos y los factores dietéticos.*

Como quiera que la gran parte de los lípidos presentes en las lesiones ateroscleróticas lo son de manera intracelular en los macrófagos, resulta sustancial considerar su participación particular en el metabolismo lipídico de la aorta (J. M. Balis, M. D. Haust y R. H. More, *Exptl. Mol. Pathol.*, 3, 511, 1964; J. C. Geer, *Am. J. Pathol.*, 47, 241, 1965; J. C. Geer, *Lab. Invest.*, 14, 1.764, 1965). Mediante la utilización de técnicas morfológicas, aunque de modo directo, tan sólo se ha podido lograr una información muy limitada sobre el metabolismo lipídico en macrófagos arteriales. Las observaciones realizadas utilizando macrófagos aislados de diversas condiciones, si bien de naturaleza indirecta, han sido capaces de suministrar un conocimiento del metabolismo lipídico que sirve de base a su ulterior extensión a la pared arterial.

La participación de los macrófagos se centra en el metabolismo de colesterol y sus esteres, triglicéridos y fosfolípidos.

Macrófagos aislados biosintetizan colesterol a partir de acetato (A. J. Day y N. H. Fidge, *J. Lipid Res.*, 5, 163, 1964), con mayor actividad específica que la conseguida por los ácidos grasos, y asimismo participan en la deposición del colesterol. Una vez capturado el colesterol por los macrófagos se esterifica parcialmente y el resto revierte al medio bajo la forma de lipoproteínas.

La incorporación de acetato-<sup>14</sup>C en colesterol, fosfolípidos y triglicéridos y la de glucosa-<sup>14</sup>C en glicerina se ha demostrado asimismo en presencia de macrófagos aislados; como en otros casos subsiste la cuestión de la significación de estos hechos en el conjunto de las circunstancias fisiológicas o patológicas de la función celular

El colesterol y sus esteres así captados permanecen en el interior de las

células durante períodos hasta de 18 meses, y esta separación se lleva a cabo más lentamente que en triglicéridos o fosfolípidos (A. J. Day, P. R. S. Gould-Hurst, R. Steinborner y M. L. Wahlqvist, *J. Atheroscler. Res.*, 5, 466, 1965); la captura de colesterol facilita la síntesis de fosfolípidos por estas células (A. J. Day, N. H. Fidge y G. N. Wilkinson, *J. Lipid Res.*, 7, 132, 1966).

De la consideración conjunta de estos hechos ha surgido interesante la hipótesis acerca de la función de la síntesis de fosfolípidos en las paredes arteriales ateroscleróticas basada en la estimulación por el colesterol de la síntesis de fosfolípidos en macrófagos arteriales; de esta manera resulta facilitada la separación de colesterol como lipoproteína (A. V. Chobanian, S. R. Cooperband y W. Hollander, *Fed. Proc.*, 24, 1083, 1965).

Los macrófagos aislados exhiben intensa actividad colesterol-esterásica y las placas ateroscleróticas que contienen elevadas proporciones de células con aspecto de espuma se corresponden con los niveles más altos de la relación oléico/linoléico. Una parte de los ácidos grasos liberados por la acción de las esterasas se reincorpora en triglicéridos y fosfolípidos (A. J. Day, N. H. Fidge, P. R. S. Gould-Hurst y G. K. Wilkinson, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 50, 248, 1965).

Los macrófagos exhiben propiedades en relación con la síntesis e hidrólisis de ésteres de colesterol que, aunque no represente de modo necesario la plenitud de este fenómeno en la pared arterial, sí permite destacar que el esquema de los ácidos grasos saturados es similar al de las placas ateroscleróticas.

Los macrófagos poseen asimismo intensa actividad lipásica y a ella se atribuye la base de la degradación de los triglicéridos en las lesiones (I. E. González, en "Evolution of the Atherosclerotic Plaque", Chicago Univ. Press, página 151, 1963), aunque no se conocen datos suficientes para extrapolar la presencia en macrófagos de enzimas lipolíticas a la patogénesis de la deposición lipídica en la pared arterial.

La posibilidad de aislamiento de estas células con aspecto de espuma a partir de lesiones ateroscleróticas (A. J. Day, H. A. I. Newman y D. B. Zilversmit, *Circulation Res.*, 19, 122, 1966) ha permitido el estudio de la incorporación elevada de  $^{32}\text{P}$  en fosfolípidos, siendo el esquema de incorporación similar al conseguido "in vitro" por la íntima arterial, principalmente fosfatidilcolina y fosfatidilinositol.

Todo el conjunto de hechos anteriores adquiere una proyección destacada al considerarse la relación macrófagos-aterosclerosis. En las lesiones experimentales hay dos tipos de células en espuma que contienen lípidos; unas del tipo de células musculares lisas y otras con las características de macrófagos, con numerosas inclusiones lipídicas, que en su origen pudieran ser monocitos sanguíneos que, penetrando el endotelio y bajo ciertas condiciones, contribuyen al contenido de estas células en las lesiones ateroscleróticas (W. J. S. Still,

*Exptl. Mol. Pathol.*, 2, 491, 1963; M. Suzuki y R. M. O'Neal, *J. Lipid Res.*, 5, 624, 1964). A pesar de estas relaciones, probadas en cuanto a su génesis, es necesario considerarlos por lo que se refiere a su relación metabólica con las arterias en su conjunto. La enzimología de los macrofagos, el mecanismo de su participación en la captura de colesterol y en la formación de lipoproteínas, el metabolismo de las células retículo-endoteliales aisladas procedentes de otros orígenes, son todas ellas facetas que requieren nuevos y más profundos estudios.

*La asociación de aterosclerosis y trombosis, bien conocida en el hombre, potencia de modo extraordinario el interés de los fundamentos bioquímicos que subyacen a la presencia de estos estados patológicos.*

La adición de ácidos grasos a la sangre o plasma acelera de modo notable la coagulación (J. C. F. Poole, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 36, 248, 1955; W. E. Connor, *J. Clin. Invest.*, 41, 1199, 1962). Los ácidos grasos saturados de cadena larga disminuyen de 31 a 3-8 minutos el tiempo de coagulación según las condiciones de experimentación. A concentraciones 3,5 mM, sólo los ácidos grasos saturados de cadena larga, palmítico y esteárico, aceleran la coagulación, en tanto que los C6 a C10 y los no saturados ejercen poco o ningún efecto. A concentraciones 3,5-35 mM, el ácido oléico disminuye asimismo el tiempo de coagulación.

La administración endovenosa de ácidos grasos saturados de cadena larga ocasiona una hipercoagulación y trombosis masiva que no es originada por los ácidos grasos de cadena corta ni por los no saturados. Una muy marcada trombocitopenia se produce en la administración de ácidos grasos de cadena larga, tanto saturados como no saturados (W. E. Connor, J. C. Hoak y E. D. Warner, *Int. Symp. Path. & Treat. of Thromboembolic Diseases*, F. K. Schattner-Verlag, página 193, 1966).

Un más preciso estudio de las relaciones aterosclerosis-trombosis se ha llevado a cabo mediante la producción experimental de aterosclerosis y ulterior estímulo trombogénico (J. C. Hoak, W. E. Connor y E. D. Warner, *Clin. Res.*, 12, 337, 1964). Mediante la administración prolongada de dietas especiales conteniendo 0,5 % de colesterol y 2,5 % de aceite de cacahuet se alcanzan niveles plasmáticos de colesterol de 2.040 mg %, fosfolípidos 420 mg % y triglicéridos 475 mg %; ello conduce a una aterosclerosis severa y a un gran estrechamiento del lumen arterial. La subsiguiente administración de ACTH ocasiona el correspondiente estímulo en la movilización de los ácidos grasos con gran incidencia de trombosis. A este propósito constituye un hecho de singular y notoria importancia la ausencia de trombosis en las arterias ateroscleróticas no ulcerativas.

Las placas ateromatosas contienen los mismos constituyentes lipídicos que el plasma, entre los que los ácidos grasos constituyen alrededor del 5 % de

los lípidos totales y, de ellos, principalmente palmítico y esteárico (C. F. Bötcher, E. Boelsma, C. Ch. Ter Haar, F. B. Woodford y C. M. van Gent, *Lancet*, *11*, 1162, 1960). Sobre la participación del material de las placas ateromatosas sobre la coagulación sanguínea, algunos autores afirman su no participación (J. E. Kirk, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *109*, 890, 1962; S. O. Byers y M. Friedman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *115*, 436, 1964) o establecen un incremento en la coagulación al actuar sobre la formación de tromboplastina (T. D. Stevenson, G. R. Schrodt y M. R. Lillie, *Am. J. Med. Sci.*, *241*, 632, 1961). Utilizando el material de las placas de la región subíntima de aortas y coronarias ateroscleróticas se ha demostrado (W. E. Connor, J. C. Hoak y E. D. Warner, *Int. Symp. Path. & Treat. of Thromboembolic Diseases*, F. K. Schattauer-Verlag, 1966) su escasa actividad tromboplástica cuando se ensaya sobre el tiempo de protrombina, pero reduce de modo notable el tiempo de coagulación —de 47 minutos a 3-6 minutos— utilizando sangre intacta. Ello sugiere que las placas ateromatosas poseen la potencialidad de acelerar la coagulación sanguínea, al parecer, de manera análoga a la acción del vidrio o ácidos grasos saturados sobre los factores de coagulación con sensibilidad de superficie; los ácidos grasos de las placas pudieran ser este material responsable de la actividad coagulante.

Cuando al comportamiento altamente aterogénico del colesterol acumulado en la pared arterial y al consiguiente engrosamiento ateromatoso de las arterias se une la responsabilidad de los triglicéridos en la iniciación de los fenómenos trombóticos, resulta el comienzo de las manifestaciones clínicas de las enfermedades arteriales coronarias.

El conocimiento exacto de las relaciones entre trombosis y desarrollo de la aterosclerosis y sus complicaciones necesita de más profundas dilucidaciones. Entre las direcciones de estudio merece un comentario la participación de las plaquetas y sus propiedades físico-químicas y factores que las afectan. Desde 1882 (G. Bizzozero, *Virchows Arch. Path. Anat.*, *90*, 261, 1882) se conoce que los trombos que ocluyen las arterias enfermas tienen en las plaquetas sus constituyentes primarios, presentes en el conjunto en forma discreta (J. E. French, R. G. McFarlane y A. G. Sanders, *Brit. J. Exp. Path.*, *45*, 467, 1964). Estas plaquetas pueden adherirse entre sí y a otras superficies bajo la influencia de diferentes estímulos, colágeno, trombina, endotoxinas, etc., a la vez que experimentan cambios estructurales y bioquímicos; entre éstos se produce la secreción de sustancias, aminoácidos, nucleótidos, ADP, siendo el adenosindifosfato la causa de la agregación de las plaquetas y de una mejor participación de los lípidos constituyentes en el proceso de coagulación (J. F. Mustard, B. Hegardt, H. C. Rowsell y R. L. MacMillan, *J. Lab. Clin. Med.*, *64*, 548, 1964). Otro tipo de productos capaces de modificar las propiedades superficiales de las plaque-

tas son los fosfolípidos, eliminando su interacción con las superficies (E. E. Nishizawa, *Fed. Proc.*, 24, 154, 1965). Dentro del grupo de fosfolípidos, la fosfatidilserina exhibe cualidades importantes en este sentido que se acrecientan con la observación de la influencia que sobre este efecto ejerce la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes; los ácidos grasos de 14 y 16 átomos de carbono ejercen el más eficaz efecto inhibitor de la coagulación, y los ácidos grasos de 10 átomos de carbono inhiben al máximo la agregación plaquetacolígeno. Circunstancias éstas que suministran una nueva oportunidad para destacar la importancia del conocimiento preciso de las estructuras de los fosfolípidos plasmáticos, sus niveles e incluso del detalle de sus especies moleculares. Al lado de estos hechos no puede quedar sin resaltar un especial matiz de aplicación al haberse observado la influencia de la fosfatidil-serina natural en la supresión de trombos extracorpóreos.

Considerando como hecho suficientemente probado la contribución de los niveles elevados de lípidos al desarrollo de los estados ateroscleróticos, la cuestión ha de plantearse en términos de qué factores epidemiológicos son capaces de influenciar estos niveles y qué fracciones lipídicas de la sangre están más complicadas con el desarrollo de la enfermedad.

Las primeras CORRELACIONES EPIDEMIOLÓGICAS datan seguramente de 1916, en que Langen (C. D. de Langen, *Geneesk. Tijdschr.*, V. *Nederl. Indie*, 56, 1, 1916) pudo observar la mayor incidencia de enfermedades coronarias en los holandeses que en los nativos de Java, y fue relacionada con el contenido de colesterol de la dieta.

Los factores alimenticios que más se consideran en la epidemiología de las enfermedades coronarias son GRASAS SATURADAS, SACAROSA y COLESTEROL, siendo tan sólo este último el factor indispensable para la inducción experimental de la aterosclerosis por métodos dietéticos (W. E. Connor, J. J. Rohwedder y M. L. Armstrong, *Cir. Res.*, 20, 658, 1967; J. Stamler, "Lectures on Preventive Cardiology", Grune & Stratton, N. Y., pág. 62, 1967; L. N. Katz, J. Stamler y R. Pick, "Nutrition and Atherosclerosis", Lea & Febiger, Philadelphia, 1958).

Animales alimentados con dietas que poseen un 0,5 por 100 de colesterol desarrollan rápidamente hipercolesteremia y las lesiones típicas en las arterias coronarias y aorta (N. Anitschkow, "Experimental arteriosclerosis in animals", en *Arteriosclerosis*, ed. E. V. Cowdry, Mc Millan Co., N. Y. 1933).

La administración prolongada de dietas ricas en grasas y en colesterol provoca intensa aterosclerosis coronaria y subsiguientemente infarto miocárdico (A. L. Myasnikov, N. N. Kipschidze y E. I. Tchazov, *Amer. Heart J.*, 61, 76, 1961; C. B. Taylor, D. E. Patton y G. E. Cox, *Arch. Path.*, 76, 404, 1963).

La ingestión diaria de colesterol guarda una correlación excelente con la mortalidad por enfermedades coronarias. En experiencias (W. E. Connor, *Ge-*

riatic, 16, 407, 1961) estadísticas llevadas a cabo en poblaciones de distintos países se han obtenido gran número de datos; algunos de los cuales figuran a continuación:

	mg/día de colesterol	Mortalidad/100.000
Estados Unidos .....	584	732
Inglaterra .....	460	470
Dinamarca .....	390	350
Bélgica .....	300	290
Italia .....	185	210
Grecia .....	148	70
Formosa .....	100	30

(Datos obtenidos en varones de 55-59 años de edad durante 1955-56.)

Toda la experiencia es unánime al apreciar una clara dependencia de las concentraciones de colesterol en suero en función del colesterol de la dieta (V. M. Wells y B. Bronte, *Brit. Med. J.*, 1, 577, 1963; F. Grande, J. T. Anderson, C. Chlouverakis, M. Proja y A. Keys, *J. Nutr.*, 87, 52, 1965; W. E. Connor, *J. Amer. Diet. Ass.*, 52, 202, 1968) en muy variadas condiciones experimentales y de su relación con los períodos de control. Este mayor énfasis en la dependencia colesterol-aterosclerosis no excluye la existencia de datos que atestiguan la participación de otros tipos de lípidos; la hipertrigliceridemia ha sido otra de las alteraciones con más definida intervención en los fenómenos ateroscleróticos (M. J. Albrink, P. H. Laviets y E. B. Man, *Ann. Intern. Med.*, 58, 305, 1963), sobre todo en estados diabéticos y obesidad.

Recientemente (M. F. Oliver, V. A. Kurien y T. W. Greenwood, *Lancet* i, 710, 1968) se ha descrito una conexión entre el desarrollo de desórdenes del ritmo cardíaco y la elevación de niveles de los ácidos grasos libres en suero; esta doble anomalía se ha relacionado con la presencia de un exceso de catecolaminas, habiéndose sugerido asimismo que la deficiente aportación de oxígeno al tejido lesionado impide la correcta oxidación de los ácidos grasos con mayores requerimientos de oxígeno que los hidratos de carbono.

Hace más de un siglo, se conoce como los hidratos de carbono de la dieta, pueden transformarse en grasas; a partir de entonces ha ido concretándose las relaciones metabólicas entre ambos tipos de compuestos, hasta llegar a definirse la función metabólica distinta de los diferentes hidratos de carbono. Estas relaciones son, sin embargo, difíciles de establecer, y se impone el estudio de la influencia de variables como a) discernir el efecto ejercido sobre el metabolismo lipídico por los hidratos de carbono de la dieta como tales o en virtud de su contribución simplemente calórica; b) la influencia de la presencia

simultánea de proteínas, etc.; c) establecer si los cambios en el metabolismo lipídico son consecuencia directa de los distintos tipos de hidratos de carbono administrados en la dieta o motivados por la falta de lípidos en la misma.

Los cambios en el metabolismo lipídico bajo la influencia de variaciones en el contenido de hidratos de carbono de la dieta han sido estudiados en hígado, tejido adiposo y suero. En suero, las variaciones afectan a los lípidos totales, lipoproteínas, colesterol, glicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos.

El tipo de hidratos de carbono en la dieta afecta a los niveles totales de lípidos en suero; así, el almidón de cereales, con una dieta pobre en lípidos, hace descender los niveles totales de lípidos, mientras que la sacarosa ejerce el efecto contrario en las mismas condiciones (I. MacDonald y D. H. Braithwaite, *Clin. Sci.*, 27, 23, 1964; M. A. Antar y M. A. Ohlson, *J. Nutr.*, 85, 329, 1965). De todas maneras, para evaluar la significación de este hecho se requerirá una evaluación estadística más rigurosa.

Los resultados obtenidos en los niveles de lipoproteínas son contradictorios; hecho explicable por las diferentes condiciones experimentales, aunque del conjunto de estos hechos parece resaltar el control de las  $\beta$ -lipoproteínas,  $S_f$  20-400, por los niveles de los hidratos de carbono de la dieta.

La variación de los niveles de colesterol es una de las más investigadas por la facilidad de las determinaciones —de un lado—, y sobre todo por la trascendencia clínica de su asociación con las alteraciones patológicas coronarias. Los niveles de colesterol resultan más elevados en dietas ricas en sacarosa que en las ricas en polisacáridos; niveles, a su vez, superiores, tanto de colesterol como de triglicéridos, cuando la sacarosa se sustituye en las dietas por glucosa o lactosa (A. Keys, J. T. Anderson y F. Grande, *J. Nutrition*, 70, 257, 1960; J. T. Anderson, F. Grande, Y. Matsumoto y A. Keys, *J. Nutrition*, 79, 349, 1963).

En un estudio sistemático para definir las características de los hidratos de carbono asociadas con la elevación del colesterol en suero (I. MacDonald, *Clin. Sci.*, 29, 193, 1965), se ha experimentado la administración de dietas libres de grasas y distintos hidratos de carbono como almidón de cereales, almidón parcialmente hidrolizado, maltosa y glucosa. Todos estos productos originan un descenso del colesterol en suero a los cinco días; con sacarosa no se observa variación alguna. La presencia de fructosa al lado de los anteriores hidratos de carbono no afecta los niveles de colesterol en suero (I. MacDonald, *Proc. Nutr. Sci.*, 25, ii, 1966).

El estado actual de la relación niveles de colesterol-hidratos de carbono de la dieta no ofrece diferencias destacadas, siendo otros factores más decisivos y dominantes en el establecimiento de dichas variaciones como la nece-

saría presencia adicional de grasas para la producción de variaciones destacadas de los niveles de colesterol.

En una consideración de la multiplicidad de factores dietéticos, Groen (J. J. Groen, "Recent advances in the epidemiology of atherosclerosis", *Progr. Bio-cleen. Pharmacol.*, 4, 1, 1968) hace resaltar que si, efectivamente, está justificada la recomendación de sustituir las grasas saturadas de la dieta por ácidos grasos poli-no saturados (American Heart Association, *News Release*, 5 junio 1964), se olvida que no es la abundancia de estos factores lo que caracteriza las dietas de las poblaciones con escasa o nula incidencia en enfermedades arteriales, sino la carencia de grasas totales y saturadas, colesterol y sacarosa, en tanto que son elevadas en almidón y proteínas vegetales.

Para explicar esta diferencia de respuesta de los lípidos en suero ante la diferente administración de almidón, sacarosa y otros mono- o di-sacáridos, se ha sugerido (A. M. Cohen y A. Teitelbaum, *Am. J. Physiol.*, 206, 105, 1964; M. A. Antar y M. A. Ohlson, *J. Nutrition*, 85, 329, 1965), que, puesto que el almidón, por la hidrólisis necesaria antes de su absorción intestinal, pasa de modo lento y prolongado al sistema circulatorio, la respuesta de insulina es pequeña en relación con la que sucede después de la administración de mono- y di-sacáridos de mucha más rápida absorción. Otra diferencia entre almidón y sacarosa que pudiera explicar la diferente respuesta de los niveles lipídicos en suero es la presencia de fructosa en este segundo caso en el lumen intestinal; esta presencia de fructosa incrementa la acción enzimática de glucosa-6-fosfatasa, fosfogluconico-deshidrogenasa, aldolasa y fructoquinasa en relación con los niveles ocasionados por la presencia de glucosa (W. M. Fitch e I. L. Chaikoff, *J. Biol. Chem.*, 235, 554, 1960; C. Carroll, *J. Nutrition*, 82, 163, 1964). El incremento de la actividad deshidrogenásica y, por tanto, de las formas reducidas de nucleótidos de piridina favorecería la lipogénesis y el correspondiente incremento de los triglicéridos en suero. Esta hipótesis no aparece, sin embargo, soportada por la observación de que el aumento de triglicéridos se produce de modo similar tanto en la administración de sacarosa como de glucosa (N. A. Kaufmann, R. Poznanski, S. H. Blondheim e Y. Stein, *Am. J. Clin. Nutr.*, 18, 261, 1966).

En la hipertrigliceridemia inducida por hidratos de carbono y en la hipercolesteremia esencial, la sacarosa incrementa los triglicéridos en suero en coincidencia con la relación directa entre la sacarosa de la dieta y la incidencia de diabetes mellitus y enfermedades ateroscleróticas (A. M. Cohen, *Am. Heart J.*, 65, 291, 1963; J. Yudkin y J. Rody, *Lancet*, 2, 6 1964). La importancia de este incremento de triglicéridos inducido por sacarosa se subraya por la relación que, como el colesterol, presenta con las enfermedades coronarias (M. J. Albrink, J. W. Meigs y E. B. Man, *Am. J. Med.*, 31, 4, 1961; M. A. Denbo-

rough, *Clin. Sci.*, 25, 115, 1963; D. Hayes y D. W. Neill, *Clin. Sci.*, 26, 185, 1964.)

El incremento en los lípidos séricos que se presenta en las enfermedades vasculares coronarias va asociado con frecuencia a una disminución en la tolerancia a la glucosa, para la causa de cuya relación se han señalado varias posibilidades (H. L. Falsetti, J. D. Schnatz, D. G. Greene e I. L. Bunnell, *Circulation*, 37, 184, 1968). Una alteración vascular pancreática puede alterar su función endocrina, la presencia de factores comunes —sinalbúmina, por ejemplo— en diabetes y enfermedades coronarias pueden conducir a la misma consecuencia, una disminuida y oculta tolerancia a la glucosa puede ejercer una tendencia individual a estas alteraciones coronarias. La tercera de estas hipótesis parece más posible, a la vista de la frecuencia de síndromes arteriales en diabetes encubiertas y de alteraciones metabólicas vasculares de animales diabéticos (A. I. Winegrad, S. Yalcin y P. D. Mulcaby, en "On the Nature and Treatment of Diabetes", ed. B. S. Leibel, Amsterdam, 1965).

Por lo que se refiere a las variaciones de fosfolípidos en suero, sus niveles se reducen con dietas pobres en grasas y altamente hidrocarbonadas, salvo en el caso de utilización de sacarosa, en que se contrarresta la tendencia a la disminución o incluso se presentan elevaciones (P. T. Knos y D. R. Bassett, *Ann. Int. Med.*, 62, 1.199, 1965; M. A. Antar y M. A. Ohlson, *J. Nutr.*, 85, 329, 1965).

Una simplificación del siempre complicado y largo estudio de las relaciones entre biosíntesis de lípidos e hidratos de carbono de la dieta consiste en la determinación del contenido lipídico en cultivos de tejidos de células aórticas crecidas en el suero de personas sometidas a dietas diversas (D. R. Rutstein, W. P. Castelli, J. C. Sullivan, J. M. Newell y R. J. Nickerson, *New Eng. J. Med.*, 271, 1, 1964).

Todas estas observaciones, aunque no puedan probar de manera exacta la disminución de los riesgos coronarios y sus complicaciones por adecuadas modificaciones dietéticas, sí poseen la suficiente convicción para ser tenidas en cuenta en un intento rápido de atenuar la responsabilidad compartida de más del 50 por 100 de las muertes en la sociedad desarrollada. Modificaciones dietéticas que basan en los lípidos el fundamento de su actuación, pero que exigen un mayor conocimiento de la contribución de los hidratos de carbono, sacarosa en particular, en la incidencia de los estados patológicos ateroscleróticos (J. Yudkin, *Post. Med.*, 44, 67, 1968).

A F. Grande y col. se deben las mejores correlaciones para establecer los cambios dietéticos necesarios para lograr una variación preconcebida de los niveles de colesterol en suero (A. Keys, J. T. Anderson y F. Grande, *Lancet*, 2, 959, 1957; *Circulation*, 19, 201, 1959; *Metab. Clin. Exptl.*, 14, 747, 1965. E. S. Fetcher, J. T. Anderson, F. Grande y A. Keys, *Amer. J. Clin. Nutrition*, 20,

475, 1967). Este método está fundado en los hechos: 1) El colesterol exógeno eleva el colesterol plasmático en proporción a la raíz cuadrada de su concentración en la dieta. 2) Los glicéridos saturados elevan el colesterol en suero en proporción a su concentración total en la dieta. 3) Los glicéridos mono-no saturados ejercen un efecto inapreciable sobre el nivel de colesterol en suero cuando sustituyen a los hidratos de carbono de modo isocalórico. 4) Los glicéridos poli-no saturados disminuyen el nivel de colesterol en proporción a su concentración en la dieta. A igualdad de concentración, los glicéridos poli-no saturados disminuyen el nivel de colesterol en la mitad de la proporción a la que resulta elevado por los glicéridos saturados. 5) La respuesta intrínseca es relativamente constante.

Destacada así la posición privilegiada de los factores dietéticos en la patogénesis de las enfermedades coronarias, no puede dejarse de lado su consideración en el seno del conjunto de factores identificados en estudios epidemiológicos (G. A. Rose y H. Blackburn, "Cardiovascular population studies", *Methods W. H. O.*, Ginebra, 1966). Formarían este conjunto: 1) Edad y sexo. 2) Grupo social étnico y económico. 3) Dieta. 4) Actividad física. 5) Hipercolesteremia. 6) Obesidad. 7) Empleo de tabaco. 8) Otras enfermedades —diabetes, hiperlipemias hereditarias, hipertensión—. 9) Factores psicológicos. 10) Factores genéticos.

Por lo que a estos últimos factores genéticos se refiere, el deficiente conocimiento del defecto básico de la aterosclerosis dificulta su estudio formal por los métodos convencionales (V. A. McKusick, en "Genetics and the Epidemiology of Chronic Diseases", ed. por J. V. Neel, U. S. Public Health Ser. pub. número 1163, 1965), y aunque sin pruebas estrictas de predisposición genética, gran número de datos sugieren una cierta naturaleza familiar de la anomalía. Algunos autores sugieren que entre las posiciones extremas que pueden representar, por ejemplo, la fenilcetonuria como enfermedad primariamente de naturaleza genética y las enfermedades infecciosas como representación típica de anomalías ambientales, los síndromes ateroscleróticos ocupan posiciones intermedias, centrales de modo predominante, con influencias hereditarias poligénicas y polifactoriales (P. T. Kuo, *An. Int. Med.*, 68, 449, 1968).

Estos comentarios, que han ido surcando la Bioquímica, la Fisiología y la Patología de los lípidos, bastan quizá para señalar direcciones que, en la amplitud de su extensión, enmarcan su proyección biológica y, sobre el gran incremento de conocimientos, cuyo ritmo se acelera sin cesar, y más importante que ellos mismos, dejan constancia de las ideas nuevas que introducen y las perspectivas que abren y transforman la visión de la naturaleza.

Y nada más. Gracias de nuevo por el honor que me habéis otorgado. Gra-

cias con mi deseo entusiasta de colaborar en las actividades de esta Real Academia, y permitidme otro público motivo de gratitud, aunque dañe la sencillez con que porta su singular personalidad y excepcional erudición, al Profesor Bustinza, que tiene la amable atención de contestar a este discurso, con una dedicación de amistad y recio afecto.

# DISCURSO DE CONTESTACION

POR EL ACADEMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. D. FLORENCIO BUSTINZA LACHIONDO

Excmo. Sr. Presidente,  
Excmos. Srs. Académicos,  
Señoras, Señores:

Acabamos de escuchar el magnífico discurso del Profesor Dr. don Angel Martín Municio; pero antes de hacer un análisis del mismo y de glosar algunos de los temas expuestos, les presentaré su historial científico y docente.

Don Angel Martín Municio lleva a cabo los estudios de Ciencias Químicas en la Universidad de Salamanca y revalida el Grado de Licenciado, con Premio Extraordinario, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, en 1947. En esta Facultad se va a iniciar su labor docente e investigadora, bajo la dirección del Prof. Lora-Tamayo, maestro de su Tesis Doctoral en Ciencias, que, con el título *Estudio de la fosfatasa y sus modelos*, merece en 1950 la calificación de Premio Extraordinario. Tras de sus estudios de Licenciatura en Farmacia, obtiene en 1954 el título de Doctor en Farmacia con la Memoria *Bioquímica de dicetopiperacinas*, que fue calificada de Sobresaliente.

De modo simultáneo dio comienzo su actuación docente en la cátedra de Química Orgánica y Bioquímica. Profesor Ayudante, primero, y luego Profesor Adjunto durante un período de cuatro años; labor que se interrumpe para realizar estudios en el extranjero durante 1951-1954, pensionado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Dirección General de Relaciones Culturales. Trabaja primero en el Max Plank Institute de Heidelberg, adiestrándose en las nuevas técnicas de investigación bioquímica, y después, durante tres años, en el Laboratorio de Química Orgánica y Bioquímica de la Universidad estatal de Utrecht, bajo la dirección del Prof. F. Kögl, sobre Bioquímica de proteínas. El año 1955 permanece en el National Institute for Medical Research de Londres, ampliando estudios, asimismo, de Bioquímica y en particular sobre interrelaciones en el metabolismo de azúcares y aminoácidos. Posteriormente fue pensionado por la Organización Europea de Cooperación y Desarrollo y por el British Council para trabajar en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Newcastle y en el Departamento de Bio-

química del King's College de Londres, esforzándose siempre en buscar el dominio lo más amplio posible de técnicas y métodos experimentales para utilizarlos en sus investigaciones y para darlos a conocer a sus colaboradores y discípulos.

En febrero de 1957 fue nombrado Investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Jefe de la Sección de Bioquímica del Instituto de Química.

Su función docente, que se interrumpió con motivo de sus estudios y especialización en el extranjero, se reanudó en 1956 al ser nombrado Profesor Encargado de la disciplina de Bioquímica en la Licenciatura de Ciencias Químicas, cargo que desempeñó sin interrupción, y el de Profesor Encargado de Fisiología Química en la Licenciatura de Biológicas durante los cursos 1957-8, 1965-6 y 1966-7, hasta que por oposición ganó la Cátedra de Química Fisiológica de nuestra Facultad de Ciencias de Madrid el 20 de febrero de 1967.

La fecunda labor investigadora del Prof. M. Municio se inició con una Beca de la Fundación "Conde de Cartagena", de esta Real Academia, y ha sido fomentada con diversas ayudas; entre otras, una Ayuda de Investigación de la Comisaría de Protección Escolar, una Ayuda de Investigación de la Fundación "Juan March" para estudios sobre Metabolismo bacteriano y una Ayuda a la Investigación Coordinada de la Comisaría Asesora de Investigación para estudios sobre Metabolismo comparado en insectos.

En la imposibilidad de analizar separadamente la totalidad de las aportaciones científicas —cuyos títulos y colaboraciones se reseñan al final de esta Memoria—, trataré de presentar algunas agrupaciones temáticas, comenzando por las INVESTIGACIONES SOBRE FOSFATASAS, realizadas bajo la dirección del Prof. Lora-Tamayo. Comenzadas en 1947, su objetivo consistió en realizar nuevas aportaciones al estudio de la fosfatasa y sus modelos. El programa inicial de estudio se centró en la influencia de distintos activantes sobre modelos de fosfatasa, para volver luego la atención a la enzima misma y penetrar más en sus características estructurales. Sobre ello versan las publicaciones (1)-(8), en colaboración con su maestro, el Prof. Lora-Tamayo, y algunas de ellas en la Revista de esta Real Academia.

Las investigaciones sobre BIOQUÍMICA DE DICETOPIPERACINAS fueron encaminadas a probar en qué medida estos anhídridos de aminoácidos toman parte en la dinámica del metabolismo. A partir de carbonato de bario- $^{14}\text{C}$  fueron sintetizadas la 2,5-dicetopiperacina-3,6- $^{14}\text{C}$  y la 3,6-dihidroximetil- $^{14}\text{C}$ -2,5-dicetopiperacina y utilizadas en una amplia serie de investigaciones metabólicas "in vivo", en las que hubo de seguirse la distribución isotópica en  $\text{CO}_2$  respiratorio, productos de eliminación, proteínas de órganos y tejidos y aminoácidos puros de ellas constituyentes. Separadas las formas isómeras cis-trans del anhídrido de

serina-<sup>14</sup>C, su metabolismo es diferente tanto en mamíferos como en bacterias, y sólo la forma "cis" es capaz de participar en cierta medida en la dinámica del metabolismo con eliminación urinaria anormal de serina-<sup>14</sup>C y la incorporación radiactiva en diversos aminoácidos proteicos, serina, glicocola, cistina y ácido glutámico. Las discusiones de estos resultados, integradas en una serie de publicaciones sobre proteínas, en colaboración con el Prof. Kögl, aparecen en las comunicaciones (13) y (14), con sus detalles metabólicos en (10) y (12) y de síntesis isotópica en (9) y (11).

Buena parte de la labor investigadora del Prof. M. Municio se ha centrado en la BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS Y METABOLISMO BACTERIANO, referidos fundamentalmente a glicocola, serina y ácido diaminopimélico. Como precursor de gran número de compuestos nitrogenados de interés fisiológico definido, la glicocola ocupa una posición excepcional en el metabolismo intermediario y, de otro lado, la interconexión de glicocola con serina y el hecho de que este aminoácido sea el precursor nitrogenado de la glicocola, de mayor interés desde el punto de vista cuantitativo, condujeron a la consideración conjunta de ambos aminoácidos en cuanto a la investigación de su origen a partir de compuestos hidrocarbonados como dihidroxiacetona y aminoazúcares. Para investigar este comportamiento precursor sintetizó, haciendo uso de técnicas siempre difíciles y muchas veces originales, glucosamina-<sup>14</sup>C y dihidroxiacetona-<sup>14</sup>C. Con dichos compuestos marcados realizó series de experiencias "in vitro" e "in vivo" en distintas condiciones, estudiando su conversión en los aminoácidos glicocola y serina (trabajos 38-42).

Los estudios sobre el ácido diaminopimélico los basó en una doble consideración fundamental de dicho aminoácido, ya que como constituyente de la pared celular de la mayor parte de las bacterias juega un importante papel en los fenómenos de crecimiento e inhibición celulares, y como precursor directo en la biosíntesis de lisina por bacterias, aparte de su interés teórico, está en la línea con los grandes problemas de la nutrición proteica y de la suplementación de aminoácidos.

Utilizó mutantes de *E. coli* auxótrofos de lisina y en los estudios previos (trabajos 25-29) precisó las condiciones óptimas para la consecución de elevados niveles de ácido diaminopimélico, la participación en su biosíntesis de fragmentos 3 C y la existencia sobre este proceso de un efecto regulador por parte de los hidratos de carbono. Realizó estudios de aumento de producción y recuperación del aminoácido (trabajo 33); estudios que relacionan el crecimiento celular y los aspectos morfológicos con la biosíntesis del ácido diaminopimélico y su mecanismo. En el proceso de biosíntesis se ha seguido con detalle la evolución de aminoácidos, cetoácidos y sus relaciones, esclarecidas con la utilización como precursores de la biosíntesis de ácido láctico-1 y 2-<sup>14</sup>C y de gli-

cerina-1,3-<sup>14</sup>C en experiencias de células en crecimiento y en reposo (trabajos 35-37). La distribución isotópica experimental que encontró en el ácido diaminopimélico fue comparada con la de los distintos procesos teóricamente operativos. Estas investigaciones del Prof. M. Municio han aportado datos interesantes sobre metabolismo de aminoácidos, en particular sobre modo de biosíntesis del ácido diaminopimélico por mutantes auxótrofos de lisina, sobre su acumulación y su relación con el comportamiento general del microorganismo.

En el transcurso de estas investigaciones, dos hechos marcaron los puntos de entronque con los estudios que posteriormente habría de desarrollar el Prof. M. Municio. En primer término, la biosíntesis y presencia en los medios de cultivo del mutante de *E. coli* utilizado, de distintos aminoácidos junto al ácido diaminopimélico y, en segundo lugar, la existencia de una acumulación simultánea de polímeros complejos extracelulares (trabajo 43), fue lo que motivó el estudio de la posición del semialdehído aspártico en la biosíntesis de aminoácidos —de un lado— y el aislamiento, caracterización y estudio de las propiedades químicas, mecanismo de acumulación y propiedades biológicas de dichos polímeros extracelulares —de otro—.

Para investigar el comportamiento del semialdehído aspártico tuvo que ser sintetizado de modo previo isotópicamente marcado con <sup>14</sup>C en las posiciones 1 y 2 con arreglo a una ruta de reacciones compleja y con notorias dificultades en el proceso de purificación. Pudo demostrar que la biosíntesis del ácido diaminopimélico resultaba afectada por la presencia de aspartal y que éste coopera al efecto inhibitorio de la lisina (trabajos 50-51). Las experiencias de incorporación isotópica requirieron llevar a cabo un fraccionamiento de los cultivos con arreglo al cual se pudiera controlar el contenido isotópico de los aminoácidos libres del medio, los presentes en los polímeros extracelulares, en las proteínas citoplasmáticas y en las paredes celulares. Este control de la acumulación isotópica fue llevada a cabo por densitometría de autorradiogramas o por medio de centelleo líquido en fragmentos de cromatogramas sobre papel, y entre las conclusiones obtenidas, probó la existencia de dos rutas metabólicas de biosíntesis de lisina y la excepcional posición del semialdehído aspártico en la biosíntesis de aminoácidos, así como su directa relación con la biosíntesis de diaminopimélico, y permitió definir nuevos aspectos de regulación metabólica.

Sobre los polímeros extracelulares de *E. coli*, ha realizado un amplio estudio sobre su caracterización química e investigación de sus propiedades biológicas (trabajos 44, 45, 49) recurriendo a las técnicas más variadas; y con los datos obtenidos pudo definir la naturaleza química de estos polímeros complejos extracelulares como constituidos por lipopolisacáridos en los que se integran cadenas de polisacárido a base de glucosa, galactosa y manoheptosa y cadenas de poli-D-glucosamina, cuyos grupos -NH<sub>2</sub> y -OH están acilados de modo prin-

cial por láurico, mirístico y  $\beta$ -hidroximirístico y las que van lábilmente unidas a cadenas polipeptídicas. Este total se une a un resto proteico facilitado por fosfolípidos constituidos casi exclusivamente por fosfatidiletanolamina en la que intervienen como más importantes ácidos grasos palmítico, esteárico, sus monoenoicos correspondientes y los C-17 y C-19 ciclopropánicos.

En cuanto a las propiedades biológicas, dichos compuestos poseen una extraordinaria toxicidad, características de hemaglutinación, propiedades protectoras de la infección y un comportamiento antigénico que fue estudiado mediante diversas técnicas inmunológicas en relación al comportamiento de paredes celulares, citoplasma y células completas.

Ha observado que la acumulación de estos polímeros complejos en los medios de cultivo tiene lugar en coincidencia con las dos etapas del crecimiento difásico, demostrado mediante el estudio cuantitativo de las propiedades inmunológicas del medio y a través de la evolución isotópica en células y en los polímeros extracelulares utilizando cultivos de células previamente marcadas con  $^{32}\text{P}$  (trabajo 47). Para que esta acumulación tenga lugar ha demostrado es necesaria la presencia de lisina, bien por su adición al medio o bien por la acción de la diaminopimélico-carboxi-liasa que existe en la segunda fase del crecimiento del microorganismo o resulta inducida, por ejemplo, en presencia de estreptomycin. Asimismo, ha observado que la penicilina produce un incremento notable de la acumulación de las lipopolisacárido-proteínas cuando la lisina está presente.

Estos hechos y otros logrados en la amplia investigación que ha realizado acerca de la influencia de antibióticos sobre las características bioquímicas del mutante de *E. coli* utilizado, han permitido concluir una relación entre su excreción al medio y la biosíntesis de la pared bacteriana. Como quiera que la presencia de penicilina incrementa los niveles extracelulares de lipopolisacárido-proteínas, polímeros en los que está presente una notable proporción de fosfatidil-etanolamina y teniendo en cuenta que los compuestos ciclopropánicos se biosintetizan a nivel lipídico a partir de los ácidos monoenoicos integrados en estructuras de fosfatidil-etanolamina, su eliminación de las células puede ser, al menos, uno de los factores del desacoplamiento inducido por la penicilina en las relaciones entre ácidos grasos no saturados y ciclopropánicos (trabajos 46, 52).

Un estudio muy detallado ha llevado a cabo al relacionar la variabilidad de las características inmunológicas de los polímeros extracelulares en función del estado de crecimiento del microorganismo, con la evolución química concretada en la variación intra y extra-celular de los ácidos grasos. Una de sus más importantes observaciones nace de la consideración de los esquemas de evolución frente al tiempo de los ácidos monoenoicos de 16 y 18 átomos de carbono y los

correspondientes C-17 y C-19 ciclopropánicos, resultando que los cultivos jóvenes poseen elevadas proporciones de los monoenoicos y pequeñas de los ciclopropánicos, se convierten los primeros en los segundos durante la primera fase de crecimiento, coincidiendo la fase de lisis celular con los máximos valores de los ácidos ciclopropánicos, y en la segunda fase del crecimiento se invierte el sentido de la transformación con una marcada biosíntesis de los no-saturados. Estas relaciones son análogas en los ácidos grasos extracelulares y se desacoplan, asimismo, profundamente en presencia de penicilina.

Estos estudios han ido con posterioridad encaminados a la averiguación de diferencias en los modos de biosíntesis de los ácidos grasos ciclopropánicos intra y extracelulares, utilizando como precursores isotópicos distintos donadores del fragmento 1 C, formiato- $^{14}\text{C}$ , serina-3- $^{14}\text{C}$  y metionina- $^{14}\text{CH}_3$  y averiguando la distribución radiactiva en cada uno de los ácidos grasos en función del estado de crecimiento del microorganismo (trabajo 53).

El Prof. M. Municio ha estudiado también la biosíntesis de los ácidos teicoicos en relación con el mucopéptido en las paredes celulares de *Staphylococcus lactis* 1<sub>3</sub>, y su brillante trabajo se publicó en la Revista de esta Real Academia de Ciencias (61, 213, 1967). Realizó experiencias utilizando simultáneamente glucosa- $^{14}\text{C}$  y fosfato- $^{32}\text{P}$  en presencia y ausencia de penicilina, investigando frente al tiempo la distribución isotópica en nucleótidos intracelulares, paredes celulares aisladas, ácidos teicoicos y mucopéptidos de ellas obtenidos y demostró que la penicilina ejerce una notable acción inhibitoria de la biosíntesis de los ácidos teicoicos de la pared celular en la misma medida que favorece la incorporación isotópica en polímeros intracelulares. También en este trabajo aporta pruebas de que la penicilina inhibe la biosíntesis del ácido aspártico intracelular y demuestra que la adición de ácido aspártico contrarresta en gran medida el efecto inhibitorio que la penicilina ejerce sobre la biosíntesis de los ácidos teicoicos.

Es decir, que examinando en una visión muy general las más importantes investigaciones del Prof. M. Municio sobre metabolismo bacteriano, podemos inferir que se iniciaron en el estudio de la producción y biosíntesis del ácido diaminopimélico, su mecanismo y su regulación, estudiando después los polímeros extracelulares y finalmente la biosíntesis de paredes bacterianas.

El Prof. M. Municio también ha estudiado con su equipo de colaboradores algunas facetas de los aspectos bioquímicos de la fisiología nerviosa, centradas en el ESTUDIO ENZIMÁTICO Y DE LA ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA. Al estudiar la actividad colinesterásica de cerebros de insectos, han aislado dos fracciones enzimáticas, estudiadas comparativamente en su especificidad, características cinéticas, de inhibición y energías de activación, sugiriendo la existencia de dos formas distintas de actividad enzimática, soportado todo ello por experiencias

inmunológicas de precipitación y de doble inmunodifusión. Las dos fracciones enzimáticas obtenidas a partir de cerebros de insectos, así como de otros preparados de colinesterasa, fueron estudiados en su comportamiento frente a la radiación gamma y las variaciones exhibidas por  $K_m$  y  $V_{max}$  sugieren que la radiación inactiva algunas moléculas y altera la especificidad de otras sin inactivarlas (trabajos 66-68, 69).

La actividad anticolinesterásica ha sido objeto de amplios estudios con largas series de compuestos, siendo las investigadas con mayor profundidad los carbamatos, fosfatos y metanfosfonatos de arilo, sustituidos de modo adecuado con objeto de controlar el grado de complementaridad con el centro activo aniónico de la enzima y el poder acilante. La inhibición enzimática en cada caso se ha determinado "in vitro" en función de la concentración para llegar a la averiguación de los valores de  $pI_{50}$ , que se correlacionan estadísticamente con los valores  $\sigma$  de Hamett; la inhibición enzimática "in vivo" permite calcular las  $DL_{50}$ , y esta actividad biológica se correlaciona con factores de tipo polar y de solubilidad, estableciéndose en cada caso el predominio correspondiente.

Gran número de resultados sobre el íntimo mecanismo de esta inhibición han sido obtenidos por el equipo de investigación del Prof. M. Municio. Entre otras conclusiones, se establece que la penetrabilidad a través de membranas biológicas de la estructura básica de los derivados fosfóricos es lo suficientemente elevada para que resulte independiente de la naturaleza de los sustituyentes; que la acción "in vivo" de los derivados fosfóricos está fuertemente gobernada por el carácter polar de los sustituyentes, siendo máxima para elevados valores de  $\sigma$ ; que los diferentes tipos de compuestos con sustituyentes alquil-mercapto, deben su elevada actividad "in vivo" a la concomitante existencia de procesos de oxidación biológica que provocan su correspondiente transformación en sulfona (trabajos 62-65).

Estos modernos análisis estadísticos para correlacionar actividades biológicas con estructuras químicas modificadores de las mismas fueron extendidos por el Prof. M. Municio al estudio de la REACCIÓN DE HILL. En estas investigaciones, utilizando cloroplastos aislados de espinaca, se ha determinado simultáneamente el desprendimiento de oxígeno, la reducción de nucleótidos de piridina y la biosíntesis del ATP, en presencia de sustancias cuyo comportamiento inhibitor o desacoplador de la fotofosforilación se estudia. La biosíntesis de ATP se estudió en presencia de fosfato- $^{32}P$ , cromatografiando sobre papel la mezcla de reacción de modo que el registro gráfico automático de la radiactividad e integración de las curvas permitiera conocer de modo sencillo las cantidades de ATP formadas. Entre los resultados obtenidos se observa que la falta de agrupamientos  $-NH-$  ocasiona una fuerte disminución del efecto inhibitor del transporte de electrones, pero no es un factor responsable de la

inhibición de la fotofosforilación, más bien debida a la influencia de factores de tipo estérico (trabajos 59, 60).

No entro a reseñar los importantes trabajos que el Prof. M. Municio y sus colaboradores (Drs. A. Ribera, M. P. Castellón y R. E. Catalán) están realizando en la trascendente dirección de BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO Y DE LA DIFERENCIACIÓN, ya que algunos de los resultados obtenidos figuran en su disertación.

El Prof. M. Municio, trabajador incansable, dotado de una voluntad firme y con inteligencia fértil, siente verdadera pasión por la docencia y por la investigación. Sabe enseñar con fe y con entusiasmo y sabe comunicar a sus colaboradores y discípulos el interés por la investigación y la grandeza del magisterio que él sabe desarrollar con amor a su disciplina y a sus discípulos.

Recuerdo de sus oposiciones a la Cátedra de la que es actualmente titular las siguientes frases: *"El Profesor debe mantener con sus alumnos un diálogo mudo aparte de aquel que versa sobre la materia que explica. Un diálogo imprescindible por el que el alumno pueda decirle que no le interesa, que no le entiende o que no sabe a dónde va a parar con sus explicaciones. Todas estas inquietudes brotan de los ojos de los alumnos, y el Profesor debe considerarlos sin perder el otro diálogo que trata del problema que se estudia..."; "además de dirigirles hacia las fuentes del saber, ha de imbuirles su espíritu y transmitirles su confianza y entusiasmo"*.

Y en la exposición del método se ocupó, al final, del papel del Profesor como árbitro del conocimiento de sus alumnos, y dijo: *"Ser justo es la primera cualidad que todo hombre reclama de quien tiene autoridad sobre él. Este sentimiento de justicia es tan innato en su corazón, que todo acto contrario le intranquiliza y le revuelve. El alumno comprende que el profesor sea exigente o severo, si se quiere, pero le hieren las maniobras desleales o los actos arbitrarios y le hacen nacer quejas y rencores."*

Su amor a nuestra Facultad de Ciencias y a la Universidad y su enorme entusiasmo le impulsaron a organizar los *Cursos de Biología Molecular*, campo extraordinariamente fascinante, que ha progresado a ritmo rápido en estos últimos años y que comprende las investigaciones cuya finalidad es lograr una interpretación lo más correcta posible de los fenómenos biológicos fundamentales a nivel molecular, campo en el que se han logrado descubrimientos extraordinarios, algunos en realidad asombrosos, y vislumbrándose en un futuro, quizá no muy lejano, que de dichos descubrimientos se infieran aplicaciones para el tratamiento de anormalidades genéticas, tratamientos de infecciones virásicas, etc.

El tuvo que vencer muchas dificultades hasta llevar el I Curso de Biología Molecular a feliz término, con los consiguientes sacrificios de tiempo y, por

qué no decirlo, también sacrificios económicos. El tuvo que recibir, atender, agasajar y hacer la presentación de los profesores extranjeros que participaron en dicho curso: doctores Arnstein, Buffa, Wilbrandt, Ledoux, Ebringer y Heckmann. Con la preparación y desarrollo de este curso nos reveló el Prof. M. Muncio su empuje y capacidad de organización, y uno de sus aciertos fue la conjunción de los distinguidos especialistas extranjeros con Profesores de distintas Facultades de nuestras Universidades y con investigadores destacados del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Junta de Energía Nuclear.

El éxito del I Curso de Biología Molecular del pasado año académico fue grande, y el Prof. M. Muncio ya participó en la apertura del II Curso el pasado 21 de enero, en la que pronunció la lección magistral de inauguración el Profesor Laín Entralgo, y está programada la participación del Premio Nobel, Profesor Kendrew, pronunciando la conferencia de clausura.

Otra muestra de la actividad docente del Prof. M. Muncio son las Conferencias Magistrales de alto nivel científico que desarrolla; las del pasado curso fueron:

*Biología Clásica y Biología Molecular.* Conferencia Plenaria de la XII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química (Pamplona, 26 junio 1967).

*Evolución de la Biología.* Universidad de Salamanca (15 noviembre 1967).

*Significación General de los Mecanismos de Regulación.* Universidad de Madrid. I Curso de Biología Molecular (20 noviembre 1967).

*Las Técnicas de Experimentación en el desarrollo de la Investigación Bioquímica.* Universidad de La Laguna (18 diciembre 1967).

*Bioquímica de las Esfingolipidosis.* Fundación "Jiménez Díaz". Madrid. IV Curso de Genética Humana (20 abril 1968).

*Evolución Molecular.* Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Madrid (27 abril 1968).

*Actualidades Químicas en Biología.* Universidad "Menéndez y Pelayo". Santander (12 agosto 1968).

*Patología Molecular.* Universidad "Menéndez y Pelayo". Santander (13 agosto 1968).

El Prof. M. Muncio es Secretario General de la Real Sociedad Española de Física y Química, a la que ha dedicado singulares quehaceres y de la que ha recibido la Medalla-Premio a su labor investigadora en 1961.

Ha sido miembro de la Comisión española de la Unión Internacional de Bioquímica y en la actualidad es representante de la Universidad española en la Conferencia Europea de Biología Molecular.

La vocación para la docencia y para la investigación del Prof. M. Municio es, pues, ejemplar. Bien conocido es el aforismo *Labor omnia vincit*, y como bien dijo el Conde Gimeno, miembro que fue de esta Real Academia de Ciencias,

*Nada humano de noble y generoso se pierde en el mundo.  
Es una semilla que tarda, pero siempre fructifica.*

Y los esfuerzos y entusiasmos que el Prof. M. Municio ha derrochado en su labor investigadora y docente, a las que se ha consagrado con plena y fervorosa entrega, han tenido eco y hoy es día grande en su vida, ya que su ingreso en esta Real Academia de Ciencias es el reconocimiento de su gran labor al servicio de dos nobles e inseparables ideales: la Universidad y la Ciencia.

Y ahora paso al análisis de su discurso, que lo inicia con una información sobre la presencia de lípidos en materiales pertenecientes a diversas eras geológicas, datos averiguados en fechas muy recientes, merced al desarrollo de la química y la bioquímica de este tipo de sustancias. Los primeros antecedentes en el orden químico-estructural datan del siglo pasado, pero hasta los últimos años no ha sido posible lograr un tecnicismo apropiado para destacar el interés y trascendencia de los lípidos. Esta distancia entre los primeros datos y el actual desarrollo de la *Biología de los lípidos* se considera en el seno de la proyección general de la Biología.

La evolución de la *Biología de los lípidos* va a centrarse en la conjugación de la gran variedad de sus estructuras químicas con toda una ordenación y una regulación funcionales. Y todos los hechos van a estar soportados por un extraordinario tecnicismo experimental para: 1) la extracción a partir de los productos naturales; 2) la separación de mezclas complejas, y 3) la dilucidación de nuevas estructuras. Tecnicismo que recoge incluso con gran detalle la separación de diversas clases de lípidos en sus especies moleculares y cuya significación biológica está en los comienzos de su interpretación.

Una vez conocido cómo se manipulan los lípidos y cómo se llega al más preciso conocimiento de su estructura en los seres vivos, se centra el discurso en su evolución molecular en la escala filogenética y los detalles más importantes de su presencia en bacterias, algas, hongos, protozoos, invertebrados acuáticos y animales terrestres; datos moleculares que pueden constituirse en definidores de especies. En el seno de especies determinadas, el conocimiento de la evolución de los lípidos permite estudios profundos sobre Bioquímica del desarrollo; en este sentido recoge el discurso diversos resultados inéditos del recipiendario y sus colaboradores, que señalan amplias direcciones de investigación sobre Bioquímica del desarrollo y de la metamorfosis. Entre los resultados se subrayan aspectos comparativos por lo que se refiere a la composición

en ácidos grasos totales de distintas especies de insectos, a los estados de su metamorfosis y a los proceso ontogénicos; estudio que se profundiza conjugando con los anteriores fenómenos la distribución de ácidos grasos en diferentes clases de lípidos, conociendo la contribución de los distintos tipos de fosfolípidos a su evolución total durante la metamorfosis y llegando a la averiguación de distribuciones posicionales de ácidos grasos en lípidos complejos.

Todo el conjunto de los lípidos, con sus niveles y sus transformaciones, como constituyentes de los seres vivos, tienen que ajustarse al estado evolutivo de cada organismo mediante la presencia en cada caso de diversos sistemas de control. Recoge a continuación el discurso las líneas generales de este control, que mediante factores enzimáticos y hormonales gobiernan su metabolismo y transporte destacando su proyección fisiopatológica. Los sistemas de más trascendente participación en el metabolismo lipídico, tejido adiposo, hígado y plasma se encuentran en conexión íntima a través de mecanismos complejos de control y de interacción múltiple: lipasas, AMP cíclico, estado energético, control hormonal y sistema nervioso. En consecuencia de estas actuaciones y como resultado del balance lipolítico en el tejido adiposo y la captura celular por órganos y tejidos, se exhiben ciertos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres. A esta, ya señalada, complejidad se une la biosíntesis "de novo" de los ácidos grasos y las diferentes características metabólicas del tejido adiposo de las diferentes especies animales. Si todo un complejo sistema de control regula los niveles de ácidos grasos libres, éstos —a su vez— participan en procesos fundamentales de regulación metabólica, glicolisis y gluconeogénesis.

La proyección de los niveles de ácidos grasos libres se destaca a continuación, teniendo en cuenta las modalidades de su transporte bajo la forma de lipoproteínas, cuya composición, propiedades químicas y físico-químicas, niveles y variaciones se estudian con profundidad.

Las alteraciones patológicas de los niveles plasmáticos de lipoproteínas se utilizan en el discurso como introducción a una reciente concepción de la Patología, la Patología Molecular, en la que inciden tratamientos múltiples y que considerada en sus líneas generales se centra en las anomalías de la absorción y del metabolismo intermediario de los lípidos.

Las anomalías metabólicas se esquematizan de modo exhaustivo de acuerdo con la naturaleza química de los lípidos y se lleva a cabo una descripción detallada en ciertos casos más importantes: alteración de lipoproteínas, ácidos grasos y esfingolípidos. La problemática química, bioquímica, genética y clínica de estas anomalías se recoge en los más importantes síndromes patológicos, abriendo seguidamente la discusión de las posibilidades de métodos terapéuticos de tratamiento de estas alteraciones genéticas capaces de restablecer el fenotipo normal.

A las consideraciones anteriores que enmarcan las manifestaciones patológicas de índole genética en el conjunto del metabolismo lipídico, y en íntima relación con el mismo, sigue un amplio estudio de la aterosclerosis arterial. El estudio que en el discurso se realiza de estas alteraciones viene introducido por una serie de datos interesantes a nivel zoológico y por unas consideraciones generales que ligan la patogénesis de ateromas y el metabolismo lipídico. Una vez establecidas ciertas premisas, el estudio se centra ampliamente sobre la composición lipídica de las arterias y sobre el metabolismo lipídico de las mismas, recogiendo las dificultades que para cualquier generalización surgen de las diversas estructuras de los lípidos, de los diferentes tipos histológicos de las lesiones ateroscleróticas y de las discrepancias exhibidas por las diferentes especies animales. Estos estudios van a desembocar en el discurso a una discusión sobre el defecto bioquímico básico que subyace a los fenómenos ateroscleróticos, sobre el especial metabolismo de los macrófagos arteriales que permiten hipotetizar acerca de su relación con las lesiones arteriales y sobre la relación aterosclerosis-trombosis desde el punto de vista de la participación de los lípidos en la aparición del estímulo trombogénico.

La aparición espontánea de estas alteraciones patológicas ha exigido la realización de amplios estudios, que a continuación se recogen en el discurso, sobre las correlaciones epidemiológicas descubiertas, centradas en factores alimenticios de modo principal y, sobre todo, grasas saturadas, colesterol e hidratos de carbono, discutiéndose finalmente la influencia variable que el tipo de hidratos de carbono ejerce sobre los niveles de lípidos y los posibles mecanismos capaces de provocar estas variaciones.

Resumiendo: Se trata de un discurso magistral, desarrollado con competencia, con autoridad, sobre un tema complejo, muy difícil, estructurado con singular maestría, con bibliografía *up to date* y enriquecido con originales y muy valiosas investigaciones inéditas del Prof. M. Municio y sus colaboradores (Drs. Ribera, Castellón y Catalán) sobre *Bioquímica del desarrollo y Metamorfosis de algunos insectos*, y que ha tenido el buen acierto de dedicarlos al ilustre entomólogo Profesor don Gonzalo Ceballos, de tan grato recuerdo para todos nosotros y cuya vacante en esta Real Academia va a ocupar el Profesor M. Municio. Entre nuestros universitarios, nadie con mayor autoridad que él para tratar sobre los temas tan variados como apasionantes que nos ha presentado en su PROYECCIÓN BIOLÓGICA DE LOS LÍPIDOS.

Y sus condiciones de pedagogía se patentizan en algunos esquemas escogidos que figuran en el discurso: el primero nos ilustra sobre cómo a partir de la ceramida-lactosido se van incorporando sucesivamente a su estructura los fragmentos necesarios para dar lugar a la formación de un gangliosido complejo, apreciándose cuatro etapas, catalizadas en orden de sucesión por las si-

guientes enzimas: sialil-transferasa, N-acetil-galactosaminil-transferasa, galactosil-transferasa y sialil-transferasa. El segundo esquema nos informa cómo a partir del trisialo-gangliosido puede irse fragmentando y cediendo sus distintas unidades constituyentes de las fracciones hidrocarbonadas y originando diversos productos de degradación. Y el tercer esquema es un resumen de las características metabólicas más importantes de los principales síndromes esfingolipídicos, tales como la enfermedad de Niemann-Pick relacionada con deficiencia de esfingomielinasa, la enfermedad de Gaucher relacionada con deficiencia en glucocerebrosidasa, la leucodistrofia metacromática relacionada con deficiencia en glicosulfatasa y la enfermedad de Tay-Sachs relacionada con deficiencia en galactosatrtransferasa.

Felicito al Profesor M. Municio por la brillante síntesis que nos ha presentado, que refleja muchos años de preparación y de trabajo, pues como bien dijo Horacio: "*Nihil sine magno vita labore dedit mortalibus*", y además nos revela una gran dosis de entusiasmo, la *hormona del alma*, como diría nuestro inolvidable don Gregorio, y sin la cual no hay posibilidad de investigación seria ni de docencia eficaz y fértil.

En la imposibilidad de glosar todos los interesantes extremos que ha tocado el Profesor M. Municio en su bien meditada y densa disertación, me limitaré a las *prostaglandinas*, a las *hormonas lipotrópicas hipofisarias*, a señalar una reciente *aplicación de los gangliosidos*, a mencionar un *descubrimiento relacionado con el colesterol* y, finalmente, haré alusión a la *trombosis coronaria*, afección de la que mueren al año en el mundo muchos millares de personas.

PROSTAGLANDINAS. En su discurso, el Profesor M. Municio, al ocuparse de la participación de diversas hormonas como uno de los factores más importantes en los fenómenos de regulación de la lipólisis, ha mencionado los trabajos de Bergström y colaboradores en relación con las *postaglandinas* y se ha referido a su acción antilipolítica, señalando asimismo que la PGE<sub>1</sub> contrarresta la acción lipolítica *in vitro* de la adrenalina, ACTH, glucagon y que las prostaglandinas E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> inhiben *in vivo* la capacidad lipolítica de las catecolaminas; y también ha señalado que su mecanismo está basado en la interferencia que ejercen en la formación de AMP-cíclico; pero por la importancia grande que han adquirido en estos últimos años las citadas prostaglandinas —sobre las que se llevan ya publicados varios libros y centenares de trabajos de investigación—, voy a referirme brevemente a dichas hormonas, ya que desde el punto de vista químico son *ácidos grasos insaturados de naturaleza especial* ("The prostaglandins: A family of Biologically Active Lipids", *Pharmacological Reviews*, Vol. 20, núm. 1, 1968, S. Bergström, L. A. Carlson y J. R. Weeks. "Les prostaglandines et leurs Effets Biologiques", A. Gajdos, *La Presse Medicale*, 76, 513, 1968).

Hacia 1930, Kurzrok y Lieb descubrieron que el semen humano actúa sobre útero humano provocando su contracción o su relajación, según que el útero fuera de mujer gestante o de mujer estéril. En 1933, Goldblatt, y en 1934, U. S. von Euler, demostraron que el plasma espermático humano estimulaba la musculatura lisa, y Von Euler halló que efectos similares se lograban con fluido seminal de mono, carnero y macho cabrío y también con extractos de vesículas seminales de carnero. Von Euler preparó extractos lipídicos de dichas glándulas vesiculares y descubrió que la actividad estaba asociada a una fracción liposoluble y de naturaleza ácida y designó con el nombre de *prostaglandina* al factor activo. Investigaciones posteriores han revelado que existen varias prostaglandinas y que diversos órganos y tejidos las contienen y que están dotadas de actividades metabólicas y biológicas variadas.

A partir de 1947, S. Bergström y sus colaboradores se han consagrado al aislamiento y dilucidación de la estructura química de esta nueva familia de hormonas, y en 1957, a partir de las vesículas seminales de carnero, lograron obtener en forma cristalizada dos prostaglandinas biológicamente activas, a las que hoy se denominan  $PGE_1$  y  $PGE_{1\alpha}$ , con potente efecto estimulante de la musculatura lisa, y la  $PGE_1$ , además, con fuerte acción vasodepresora. Gracias a las técnicas de cromatografía en columna de ácido silícico y cromatografía en capa fina y a los métodos biológicos de identificación se aislaron de las vesículas seminales de carnero y del tejido pulmonar seis prostaglandinas denominadas primarias, y luego se han aislado de diversos órganos, aunque a veces un determinado órgano sólo contiene un determinado tipo de prostaglandina.

Para dilucidar la estructura química de las prostaglandinas, Bergström y colaboradores tuvieron que vencer multitud de dificultades; pero gracias a las técnicas modernas de cromatografía en fase gaseosa pudieron separar los productos de degradación química de las prostaglandinas y mediante la espectrometría de masas y las técnicas de difracción de rayos X pudieron aclarar su estructura.

Gracias a Bergström y colaboradores sabemos que las prostaglandinas, nueva familia de hormonas, son ácidos orgánicos de 20 átomos de carbono, derivados de una estructura base, el llamado *ácido prostanoico*, que encierra en su molécula un anillo pentagonal. En la prostaglandina  $PGE_1$ , el anillo lleva un grupo  $C=O$  y un grupo  $-OH$  y en una de sus cadenas laterales lleva un doble enlace y un nuevo  $-OH$ , siendo químicamente  $(-)-11\alpha,15(S)$ -dihidroxi-9-oxo-13-trans-prostenoico. Otras prostaglandinas poseen dos o tres dobles enlaces.

En el líquido seminal humano, que es el fluido biológico que posee mayor actividad prostaglandínica, se han identificado 13 prostaglandinas diferentes. Se sabe que dichas sustancias se forman a partir de ácidos grasos libres y que

algunas prostaglandinas se derivan del ácido araquidónico, 5,8,11,14-eicosatetraenoico.

Es curioso que los aceites vegetales no contienen ácido araquidónico, pero algunos sí contienen el ácido C-20 normal, saturado, ácido araquídico, que se encuentra en el aceite de cacahuete en proporción de 2,4 por ciento del total de ácidos grasos saturados, aunque el aceite de semilla de alfalfa es más rico en ácido araquídico hasta un 10,3 por ciento y las semillas de las Sapindaceae son extraordinariamente ricas en ácido araquídico, ya que el aceite de *Nephe-lium lappaceum* contiene hasta 34,7 por ciento (H. J. Deuel, "The lipids. Their Chemistry and Biochemistry", *Interscience Pub.*, Vol. I, pág. 208, 1951).

En cambio, abunda en los aceites de algunas semillas, tales como las de soja, lino, cártamo, etc., los ácidos no saturados esenciales C-18 con dos dobles enlaces (linoleico) o con tres dobles enlaces (linolénico), e incluso se emplean en terapéutica el linoleico y el linolénico o los aceites que los contienen para evitar que una aterosclerosis establecida desemboque en trombosis coronaria, pues se estima que estos ácidos disminuyen el nivel de colesterol en sangre. Por otra parte, es interesante señalar que en la composición de los lípidos de las laminillas de los grana de los cloroplastos, aparte de su contenido en fosfolípidos, sulfolípidos y galactosilglicéridos, entran elevada proporción de los ácidos linoleico y linolénico.

El ácido araquídico, en general, no es componente normal de grasas animales en cantidad apreciable, aunque Ellis e Isbell dan cuenta de que la grasa de cerdos alimentados con dietas a base de semillas de cacahuete pueden contener ácido araquídico. Pero el ácido araquidónico sí está ampliamente distribuido en las grasas animales, y los lípidos de las suprarrenales contienen hasta el 11,2 por ciento del total de ácidos grasos y los fosfolípidos de suprarrenales contienen hasta un 22 por ciento, y según Holman, la fuente práctica para la obtención del ácido araquidónico es el testículo de toro.

No existiendo el ácido araquidónico en los alimentos vegetales, se estima que debe ser sintetizado en los tejidos animales *in situ*, y probablemente el C-20 dienoico y el C-20 trienoico serán los intermedios obligados en la biosíntesis del ácido araquidónico con sus cuatro enlaces etilénicos.

Después de estas nociones sobre la química de las prostaglandinas, pasemos a señalar algunos de sus efectos fisiológicos. Ya he mencionado su acción sobre el músculo uterino humano grávido; pues bien, como una eyaculación de un varón normal contiene de 150 a 200  $\mu\text{g}$  de prostaglandinas y, según Sandberg, son absorbidas por la pared vaginal, se especula sobre si esa dosis será o no suficiente para provocar en algunos casos un aborto o un parto prematuro.

Algunas prostaglandinas producen vasodilatación periférica de las arteriolas,

con disminución de la presión arterial, y la llamada *medulina renal*, cuyo efecto hipotensor es bien patente, se ha identificado con la prostaglandina  $PGA_2$ .

Desde el punto de vista del metabolismo lipídico, al que ya se ha referido el Profesor M. Municio, las  $PGE_1$  y  $PGE_2$  inhiben la lipólisis normal acelerada por las siguientes hormonas: adrenalina, noradrenalina, glucágon, ACTH, tiroestimulina y vasopresina, las cuales actúan activando la triglicérido-lipasa por intermedio del AMP-cíclico (adenosin 3',5'-monofasto), que se forma a expensas del ATP por la acción de la enzima AMP-ciclasa. Es decir, las mencionadas hormonas activan la AMP-ciclasa que cataliza la formación del AMP cíclico y éste activa a la triglicérido-lipasa, que desdobla a los triglicéridos en ácidos grasos y diglicérido. Por tanto, el mecanismo bioquímico de la acción de las prostaglandinas sobre la lipólisis queda aclarado: la  $PGE_1$  y también otras prostaglandinas, tales como  $PGE_2$  y  $PGE_3$ , bloquean la formación del AMP cíclico, es decir, se oponen a la acumulación del AMP cíclico y, por tanto, a la activación de la triglicérido-lipasa inactiva.

Dato curioso es que la *valinomicina* también inhibe la lipólisis inducida por la norepinefrina en células adiposas aisladas, por el mismo mecanismo que las prostaglandinas, es decir, inhibe la AMP-ciclasa (Kuo y Dill, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 333, 1968).

También se admite la presencia de prostaglandinas en el sistema nervioso, aunque se ignora la misión que puedan realizar.

Este campo de la investigación en relación con las prostaglandinas está actualmente en activa exploración, y sin duda conducirá a descubrimientos de gran interés fisiológico.

**HORMONAS LIPOLÍTICAS HIPOFISARIAS.** Ya que las prostaglandinas poseen actividad antilipolítica, me referiré brevemente a las nuevas hormonas hipofisarias con actividad lipolítica.

A partir de las experiencias de Anselmini y Hoffman en 1931, se sospechaba que la hipófisis podía desempeñar cierto papel en el metabolismo del tejido adiposo; pero han sido principalmente las investigaciones en estos últimos años realizadas por Li, Chrétien y colaboradores en el Laboratorio de Hormonas Hipofisarias de la Universidad de Montreal, las que han conducido al aislamiento primero y luego a la dilucidación de la estructura química de las hormonas lipolíticas hipofisarias o *lipotropinas*, obtenidas a partir de hipófisis de oveja, cerdo y buey.

La hormona lipotrófica beta, obtenida de hipófisis de oveja, está formada por 90 aminoácidos cuya secuencia está dilucidada y con la particularidad de que desde la posición 41 a la 58 coincide con la estructura completa de la hormona melanoestimulante beta, y según Chrétien ("Les hormones lipolytiques hypophysaires", *L'Union Med. Can.*, 97, Fev. 1968), es probable que la secuen-

cia de aminoácidos 41 a 58 sea la responsable de la actividad lipolítica y melanoestimulante de la hormona lipotrópica beta. La hormona lipotrópica gamma de la hipófisis de oveja es enteramente idéntica a la secuencia de los 58 primeros aminoácidos de la lipotropina beta. También, según el Dr. Chrétien, existe evidencia experimental de que tales hormonas lipolíticas se hallan también en las hipófisis humanas.

**GANGLIÓSIDO-CEREBRÓSIDO.** En 1898, Wassermann y Takaki descubrieron que la toxina tetánica se combina con el tejido nervioso, y en 1959, Van Heyningen y colaboradores descubrieron que, entre los componentes del tejido nervioso, son los gangliósidos los que fijan la toxina tetánica, y en un trabajo muy reciente de Van Heyningen y colaboradores (*J. Gen. Microbiol.*, 54, 161, 1968), titulado *Ganglioside as a prophylactic agent in experimental tetanus in mice*, dan cuenta de que los síntomas del tétano en ratones resultantes de la inyección intramuscular de toxina tetánica purificada o de bacilos vivos, en fase vegetativa, de *Clostridium tetani*, pueden ser parcialmente evitados si se les inyecta simultáneamente o pocas horas antes o después un preparado de gangliósidos o una suspensión de un complejo gangliósido-cerebrósido, y sugieren que la inyección de ese complejo en el sitio de la lesión podría tener valor profiláctico en el tétano humano.

**COLESTEROL Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.** Los Drs. J. Hradec y Z. Dusek, del Departamento de Bioquímica de Praga, han descubierto (*Biochem. J.*, 110, 1, 1968) que los lípidos desempeñan un papel importante en la síntesis de los complejos aminoacil-sRNA, cuya formación constituye una fase previa a su utilización por los ribosomas para formar las cadenas peptídicas y que el lípido activo es un ester del colesterol —el 14-metilhexadecanoato de colesterilo—, el cual estimula la actividad de las enzimas específicas que intervienen en la activación de los aminoácidos y síntesis de los aminoacil-sRNA.

**ATEROSCLEROSIS Y TROMBOSIS CORONARIAS.** Cuando preparaba yo estas líneas tuve a mi disposición el original del discurso del Profesor M. Municio, y al llegar a la última parte, en la que se ocupa de algunos aspectos bioquímicos relacionados con la aterosclerosis y las enfermedades vasculares coronarias, su lectura me trajo el recuerdo de tres amigos fallecidos: Alexander Fleming, J. L. Arteta y Howard Florey. Alexander Fleming falleció el día 11 de marzo de 1955 como había vivido, con sencillez, sin molestar a nadie, dulcemente... La autopsia reveló placas de ateroma y trombos en las coronarias, es decir, murió de *trombosis coronaria*. Una reproducción de la mascarilla de Fleming la tengo siempre a mi lado, en mi despacho, y refleja paz, calma, bondad, placidez, serenidad y nobleza, y a pesar de tratarse de una reproducción plástica, irradia dulzura, grandeza, sublimidad. No hay en ella nada que refleje rictus de dolor. Quiero recordarles que pocos días antes de su muerte, concretamente

el día 5 de marzo, sábado, los Fleming se trasladaron a The Dhoon a pasar el "week-end", y, aprovechando esa circunstancia, los ladrones forzaron y rompieron la puerta de entrada y saquearon el piso en 20 A, Danvers St., en Chelsea, Londres. Es evidente que esa contrariedad debió producir en el hombre que tanto bien había hecho a la Humanidad, momentos de amargura y un estado emocional que pudo contribuir a acelerar su muerte pocos días después, aunque, naturalmente, la lesión ateromatosa coronaria llevaría incubándose desde hacía mucho tiempo.

Esta evocación de la muerte de Fleming me trajo también el recuerdo del Prof. Dr. J. L. Arteta y de Sir Howard Florey. El Dr. J. L. Arteta, distinguido fisiólogo y anatomopatólogo, y de quien el Dr. Marañón dijo que fue de estos heroicos empecinados en hacer pura Ciencia en España, tuvo la gentileza, el día 7 de febrero de 1957, de explicarme en su laboratorio del Instituto Cajal la génesis del ateroma, indicándome incluso que se daban casos en niños de cinco años, y me mostró una aorta con ateroma, luego abrió el corazón de un perro y me hizo palpar la pared blanda del ventrículo derecho y la pared más dura, por ser más musculosa, del ventrículo izquierdo, y también me mostró, dentro de la aorta, las tres válvulas sigmoideas o semilunares, en forma de nido de golondrina, y el sitio de la aorta por donde salen las dos arterias coronarias de pequeño diámetro, las cuales, después de un corto recorrido libre, penetran en la pared del corazón. Hablando con Arteta sobre la muerte de Fleming, comenté que fumaba mucho, y Arteta me dijo que la nicotina es un tóxico vascular y especialmente de las coronarias, y que era seguro que un reconocimiento minucioso de Sir Alexander semanas antes de su fallecimiento hubiera revelado alguna lesión coronaria.

En cuanto a recordar a Sir Howard Florey, nada tiene de particular, ya que su nombre va ligado a los de Fleming y Chain en relación con la penicilina; pero, además, Florey, fallecido el 21 de febrero de 1968, ha sido un distinguido Patólogo Experimental y ha realizado investigaciones sobre regeneración del endotelio aórtico y sobre la patología de la aterosclerosis y de la trombosis coronaria. Precisamente, el 10 de diciembre de 1958 escuché su trascendental conferencia sobre *Atherosclerosis* en el Instituto Cajal, y años después leí su Discurso Presidencial del 30 de noviembre de 1962, a la Royal Society, sobre *Coronary Thrombosis and the Pathologist*, en el que, entre otras cosas interesantes, dice, refiriéndose a la aterosclerosis: "... and that it is not exclusively a product of modern civilization is demonstrated by the fact that fragments of the aorta from Egyptian mummies dating from 1500 BC to 525 AD show typical lesions" (*New Scientist*, 13 diciembre 1962, pág. 615).

Y en el discurso que pronunció, con el título de *Prestige in Academic Scientific Research*, el 15 de febrero de 1962, en el banquete anual del Parliamentary

and Scientific Committee (*Nature*, 193, 1017, 1962), hizo Florey una comparación entre las dificultades que hoy existen en las Universidades para investigar y las enfermedades coronarias, y no estará de más el recordar exactamente sus frases, porque estimo que son de actualidad:

*“Possibly the difficulties I know to exist in Universities can be likened to the sort of arterial disease from which, on statistical grounds, it can be confidently stated that many of us are suffering. The disease may not produce overt symptoms, but a pathologist knows that it needs as little as a centimetre of the coronary arteries to go seriously wrong to produce crippling consequences.”*

Y sigue así:

*“University research is the coronary artery system of the scientific world. It will no matter much what we do to the rest of the scientific organizations if the coronary arteries of university research are allowed to thrombose.”*

Y añade:

*“In contrast to human coronary disease, for which little significant can be done at present, therapy for university science is not impossible.”*

Y voy a terminar dando la bienvenida muy efusivamente al Profesor M. Mucio, en este día de júbilo para esta Corporación, y quiero expresarle, en nombre todos, el deseo de que su vida entre nosotros sea muy dilatada y fecunda.

Tengo el convencimiento sincero de que se incorpora a esta Real Academia con el firme propósito de continuar su obra investigadora, ya brillante para su edad, y al felicitarle por su ingreso, felicito también a los miembros de esta Institución por haber tenido el gran acierto de elegirle, porque estoy seguro que con su preparación y entusiasmo ha de proporcionar días de gloria a la Ciencia española y, por ende, a esta Real Academia de Ciencias.

He dicho.

## PUBLICACIONES

1. ACCION DE IONES METALICOS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA. *Revista Real Academia de Ciencias*, 44, 192 (1950).
2. ACCION DE AMINOACIDOS SOLOS Y CON IONES METALICOS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA. *Revista Real Academia de Ciencias*, 44, 233 (1950).
3. DIALISIS DE LA FOSFATASA RENAL. *Revista Real Academia de Ciencias*, 45, 91 (1951).
4. INVESTIGACIONES SOBRE FOSFATASAS. VII. ACCION DE IONES METALICOS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA (Col. con M. Lora-Tamayo). *Anal. Quim.*, 46, 55 (1950).
5. INVESTIGACIONES SOBRE FOSFATASAS. X. ACCION DE AMINOACIDOS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA (Col. con M. Lora-Tamayo). *Anal. Quim.*, 47, 143 (1951).
6. INVESTIGACIONES SOBRE FOSFATASA. XI. ACCION AMIDASICA DE LA FOSFATASA RENAL (Col. con M. Lora-Tamayo). *Anal. Quim.*, 47, 149 (1951).
7. COENZYME OF KIDNEY PHOSPHATASE (Col. con M. Lora-Tamayo). *Nature*, 168, 249 (1951).
8. LA COMPOSITION DE LA PHOSPHATASE RENALE (Col. con M. Lora-Tamayo). *Enzymologie*, 15, 377 (1953).
9. BIOQUIMICA DE DICETOPIPERACINAS. I. SINTESIS DE 2,5-DICETOPIPERACINA-3,6-<sup>14</sup>C. *Anal. Quim.*, 51, 469 (1955).
10. BIOQUIMICA DE DICETOPIPERACINAS. II. METABOLISMO DE 2,5-DICETOPIPERACINA-3,6-<sup>14</sup>C. *Anal. Quim.*, 51, 557 (1955).
11. BIOQUIMICA DE DICETOPIPERACINAS. III. SINTESIS DE 3,6-DIOXIMETIL-<sup>14</sup>C-2,5-DICETOPIPERACINA. *Anal. Quim.*, 51, 565 (1955).
12. BIOQUIMICA DE DICETOPIPERACINAS. IV. METABOLISMO DE 3,6-DIOXIMETIL-<sup>14</sup>C-2,5-DICETOPIPERACINA. *Anal. Quim.*, 51, 721 (1955).
13. UNTERSUCHUNGEN IN BEZIEHUNG ZU EIWEISS PROBLEMEN. V. (Col. con F. Kögl). *Zeitschrift Physiol. Chem.*, 300, 6 (1955).
14. UNTERSUCHUNGEN IN BEZIEHUNG ZU EIWEISS PROBLEMEN. VI. (Col. con F. Kögl). *Zeitschrift Physiol. Chem.*, 300, 17 (1955).
15. SEPARACION DE CISTINA DE HIDROLIZADOS DE PROTEINAS. *Anal. Quim.*, 51, 429 (1955).
16. SOBRE LA OXIDACION DEL PIRIDIN-4-TIOL (Col. con J. Angulo). *Anal. Quim.*, 54, 383 (1958).
17. PHIRIDINE-4-SULPHONIC ACID (Col. con J. Angulo). *Chem. and Ind.*, 1175 (1958).
18. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. I. 2-ACETOXI-4-ACETAMIDOBENCENOSULFONAMIDAS Y 2-HIDROXI-4-ACETAMIDOBENCENOSULFON-HIDRAZIDA (Col. con M. Lora-Tamayo, L. Aguado y J. L. Ruiz). *Anal. Quim.*, 55, 523 (1959).
19. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. II. SINTESIS DE PIRIDIN-4-SULFONAMIDAS (Col. con J. Angulo). *Anal. Quim.*, 55, 527 (1959).

20. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. III. ISONICOTINOIL-AMINOACIDO- HIDRAZIDAS E HIDRAZONAS (Col. con A. Ribera). *Anal. Quím.*, 56, 303 (1960).
21. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. IV. SINTESIS DE N-OXIDO PIRIDIN-4 -SULFONAMIDAS, -SULFOHIDRAZIDAS Y -SULFOHIDRAZONAS (Col con J. Angulo). *Anal. Quím.*, 56, 395 (1960).
22. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. V. DERIVADOS DEL ACIDO 2-HIDROXI-4-ACETAMIDOBENCENOSULFONICO (Col. con M. Lora-Tamayo y J. L. Ruiz). *Anal. Quím.*, 56, 403 (1960).
23. ANTITUBERCULOSOS POTENCIALES. VI. SOBRE LA DESACETILACION DE 2-ACETOXI-4-ACETAMIDOBENCENOSULFONAMIDAS (Col. con M. Lora-Tamayo y L. Aguado). *Anal. Quím.*, 56, 596 (1960).
24. TOSIL-PEPTIDOS (Col. con A. Muro). Abst. V. Jornadas Bioquímicas Latinas.
25. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. I. MEDIO MINIMO DE GLUCOSA (Col. con J. Angulo, T. Díaz, J. Herrera y W. Rivero). *Anal. Quím.*, 55, 697 (1959).
26. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. II. UTILIZACION DE MONOSACARIDOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO (Col. con J. Angulo, T. Díaz, J. Herrera y W. Rivero). *Anal. Quím.*, 55, 705 (1959).
27. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. III. ESTUDIO COMPARADO DE LA UTILIZACION DE MONO Y DISACARIDOS (Col. con J. Angulo, T. Díaz, J. Herrera y W. Rivero). *Anal. Quím.*, 55, 759 (1959).
28. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. IV. UTILIZACION DE POLIALCOHOLES (Col. con J. Angulo, T. Díaz, J. Herrera y W. Rivero). *Anal. Quím.*, 56, 311 (1960).
29. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. V. INFLUENCIA DE ACIDOS CARBOXILICOS (Col. con J. Angulo, T. Díaz y J. Herrera). *Anal. Quím.*, 56, 317 (1960).
30. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. VI. SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN MUTANTE AUXOTROFO DE LISINA (Col. con J. Angulo, T. Díaz y W. Rivero). *Anal. Quím.*, 56 413 (1960).
31. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. VII UTILIZACION DE DISTINTAS FUENTES CARBONADAS POR RESTING-GELLS (Col. con J. Angulo y T. Díaz). *Anal. Quím.*, 56, 749 (1960).
32. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. VIII. COMPORTAMIENTO PRECURSOR DEL ACIDO DICETOPIMELICO Y LA FORMACION DE ACIDO DIPICOLINICO (Col. con J. Angulo y T. Díaz). *Anal. Quím.*, 56, 761 (1960).
33. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. IX. ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE TRANSPORTE DE OXIGENO (Col. con J. Angulo y T. Díaz). *Anal. Quím.*, 57, 211 (1961).
34. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. X. SOBRE LA PRESENCIA DE UN SISTEMA LISANTE EN EL MEDIO DE CULTIVO (Col. con T. Díaz y M. Ledieu). *Anal. Quím.*, 57, 553 (1961).
35. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. XI UTILIZACION DE  $^{14}\text{CO}_2$  (Col. con M. A. Madariaga). *Anal. Quím.*, 57, 807 (1961).
36. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. XII. EVOLUCION DE OXO- Y AMINO-DERIVADOS (Col. con M. A. Madariaga y G. Baluja). *Anal. Quím.*, 59, 215 (1963).
37. BIOSINTESIS DE ACIDO DIAMINOPIMELICO EN E. COLI. XIII. UTILIZACION DE ACIDOS LACTICO-1- $^{14}\text{C}$  Y LACTICO-2- $^{14}\text{C}$  (Col. con M. A. Madariaga). *Anal. Quím.*, 59, 221 (1963).
38. BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS. PRECURSORES DE SERINA Y GLICOCOLA. *Las Ciencias*, 21, 1 (1957).

39. SOBRE LA SINTESIS DE DIHIDROXIACETONA-<sup>14</sup>C (Col. con J. Bermejo). *Anal. Quím.*, 56, 661 (1960).
40. BIOSINTESIS DE GLICOCOLA. I. SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRECURSOR DE GLUCOSAMINA-1-<sup>14</sup>C (Col. con M. Mallol). *Anal. Quím.*, 56, 623 (1960).
41. SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSAMINA (Col. con M. Mallol). *Las Ciencias*, 23, 335 (1958).
42. BIOSINTESIS DE GLICOCOLA. II. COMPORTAMIENTO PRECURSOR DE DIHIDROXIACETONA-<sup>14</sup>C (Col. con J. Bermejo). *Anal. Quím.*, 56, 743 (1960).
43. THE PRESENCE OF A MUCOPEPTIDE IN THE MEDIA OF AN E. COLI MUTANT AND ITS RELATION TO THE CELL WALL (Col. con T. Díaz y A. Martínez). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11, 195 (1963).
44. ESTUDIO QUIMICO E INMUNOLOGICO DE UN MUCOPEPTIDO AISLADO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE UN MUTANTE DE E. COLI (Col. con P. Castellón, T. Díaz y A. Martínez). *Anal. Quím.*, 59, 231 (1963).
45. IMMUNOLOGICAL STUDIES ON SOLUBLE MUCOPEPTIDE ISOLATED FROM E. COLI MEDIA (Col. con A. Martínez, T. Díaz y E. M. Eckardt). *Anal. Quím.*, 61, 1051 (1965).
46. INTRA- AND EXTRACELLULAR FATTY ACID DISTRIBUTION IN E. COLI 26-26 (Col. con E. M. Eckardt). *Anal. Quím.*, 61, 1233 (1965).
47. SOBRE EL MECANISMO DE ACUMULACION EXTRACELULAR DE LIPOPOLISACARIDO-PROTEINA POR E. COLI 26-26. UTILIZACION DE CELULAS <sup>32</sup>P (Col. con T. Díaz). *Anal. Quím.*, 62, 527 (1966).
48. SOBRE EL MECANISMO DE ACUMULACION EXTRACELULAR DE LIPOPOLISACARIDO-PROTEINA POR E. COLI 26-26. INDUCCION DE DIAMINOPIMELICO-CARBOXILASA EN PRESENCIA DE ESTREPTOMICINA (Col. con P. Castellón, T. Díaz y E. M. Eckardt). *Anal. Quím.*, 62, 747 (1966).
49. NATURALEZA QUIMICA Y PROPIEDADES BIOLOGICAS DE LIPOPOLISACARIDO-PROTEINAS EXTRACELULARES DE E. COLI (Col. con P. Castellón, T. Díaz, E. M. Eckardt y A. Martínez). *Anal. Quím.*, 62, 875 (1966).
50. SINTESIS DE ASPARTAL-<sup>14</sup>C (Col. con A. Vega). *Anal. Quím.*, 62, 769 (1966).
51. THE INFLUENCE OF ASPARTIC SEMIALDEHYDE AS PRECURSOR OF INTRA- AND EXTRACELLULAR AMINOACIDS IN E. COLI 26-26 (Col. con A. Vega). *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 317 (1966).
52. INDUCED CHANGES BY PENICILLIN IN THE TIME-COURSE OF INTRA AND EXTRACELLULAR FATTY ACID SPECTRA OF E. COLI (Col. con E. M. Eckardt). *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 207 (1967).
53. UTILIZATION OF DIFFERENT ONE CARBON DONORS IN THE BIOSYNTHESIS OF INTRA- AND EXTRACELLULAR CYCLOPROPANE ACIDS BY E. COLI (Col. con M. P. Castellón, E. M. Eckardt y A. Ribera). *Biochim. Biophys. Acta*, en prensa.
54. BIOSINTESIS DE ACIDOS TEICOICOS Y MUCOPEPTIDOS EN PAREDES CELULARES DE STAPHYLOCOCCUS LACTIS I 3. *Revista Real Academia de Ciencias*, 61, 213 (1967).
55. REACTIVITY OF SOME UNSATURATED KETONES TOWARD SH-COMPOUNDS AND THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITY (Col. con G. Baluja y S. Vega). *Chem. and Ind.*, 50, 2053 (1964).
56. SINTESIS DE CETONAS  $\alpha,\beta$ -NO SATURADAS. REACCIONABILIDAD FRENTE A GRUPOS -SH (Col. con G. Baluja y S. Vega). *Anal. Quím.*, 60, 639 (1964).
57. INFLUENCIA DE LA CLOROSUSTITUCION EN FENOLES SOBRE LA REACCION DE HILL (Col. con A. Alcaide). *Anal. Quím.*, 60, 683 (1964).
58. INFLUENCIA DE CETONAS  $\alpha,\beta$ -NO SATURADAS SOBRE LA REACCION DE HILL (Col. con A. Alcaide y S. Vega). *Anal. Quím.*, 60, 679 (1964).

59. SOBRE LA INHIBICION DE LA REACCION DE HILL. INFLUENCIA DE FACTORES ESTRUCTURALES (Col. con A. Alcaide, A. Ribera y M. D. Stamm). *Anal. Quim.*, 62, 1391 (1966).
60. INHIBITION AND UNCOUPLING OF PHOTOPHOSPHORYLATION (Col. con A. Alcaide). *Biochim. Biophys. Acta*, 131, 195 (1967).
61. SINTESIS Y ACTIVIDAD ANTICOLINESTERASICA DE UNA SERIE DE N,N-DIMETILSULFAMATOS DE ARILO (Col. con C. Corral). *Anal. Quim.*, 60, 341 (1964).
62. ANTICHOLINESTERASES. I. INFLUENCE OF ELECTRONIC AND STERIC FACTORS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF DIALKYL ARYL PHOSPHATES (Col. con C. Corral, E. González y A. Ribera). *Anal. Quim.*, 62, 503 (1966).
63. ANTICHOLINESTERASES. II. INFLUENCE OF ELECTRONIC AND STERIC FACTORS OF ARYL-N-METHYL-CARBAMATES (Col. con E. González y A. Ribera). *Anal. Quim.*, 62, 975 (1966).
64. ANTICHOLINESTERASES. III. INFLUENCE OF STRUCTURAL FACTORS ON THE IN VIVO BIOLOGICAL ACTIVITY (Col. con E. González y A. Ribera). *Anal. Quim.*, 63, 261 (1967).
65. ANTICHOLINESTERASES. IV. INFLUENCE OF ELECTRONIC AND STERIC FACTORS OF ARYL METHANPHOSPHONATES (Col. A. Relimpio y A. Ribera). *Anal. Quim.*, en prensa.
66. IN VITRO EFFECT OF GAMMA RADIATION ON DIFFERENT CHOLINESTERASE PREPARATIONS (Col. con E. Catalán). *Nature*, 208, 1227 (1965).
67. IN VITRO AND IN VIVO EFFECT OF GAMMA RADIATION AND ENZYME INHIBITORS ON SEVERAL COMMON-FLY BRAIN CHOLINESTERASE PREPARATIONS (Col. E. Catalán). *Anal. Quim.*, 63, 1145 (1967).
68. NATURALEZA DE LA COLINESTERASA DE CEREBRO DE MOSCA DOMESTICA (Col. con A. Alemany y C. G. Barberán). *Anal. Quim.*, 62, 895 (1966).
69. ESTUDIOS INMUNOLOGICOS SOBRE COLINESTERASA (Col. con R. E. Catalán y A. Martínez). *Anal. Quim.*, 63, 850 (1967).
70. INFLUENCIA DEL AMITROL SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS (Col. con L. Franco). Abst. XII Reunión Bienal R. S. E. F. Q. (1967).
71. SIGNIFICACION BIOLOGICA Y DISTRIBUCION DE LIPASAS EN INSECTOS (Col. con S. Vega). Abst. XII Reunión Bienal R. S. E. F. Q. (1967).
72. FATTY ACIDS AND PHOSPHOLIPIDS OF SEVERAL DIPTERA (Col. con C. Barroso y A. Ribera). Abst. VII Int. Con. Biochem. (Tokio, 1967).
73. BIOCHEMISTRY OF THE DEVELOPMENT OF THE INSECTS DACUS OLEAE AND CERATITIS CAPITATA. EVOLUTION OF TOTAL FATTY ACIDS (Col. con C. Barroso y A. Ribera). *Comp. Biochem. and Physiol.*, 28, 239 (1969).
74. BIOCHEMISTRY OF THE DEVELOPMENT OF THE INSECT CERATITIS CAPITATA. EVOLUTION OF FATTY ACIDS FROM NEUTRAL LIPIDS IN THE LARVARIAL ONTOGENESIS (Col. con F. Díaz Espada, J. Ortín y A. Ribera). *Comp. Biochem. and Physiol.*, en prensa.