

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

DEFICIT DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LA CIRROSIS
HEPÁTICA. RELACION CON LA MALNUTRICION.

Juana González García

Universidad de Granada
1990



ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D.ª JUANA GONZALEZ GARCIA
LICENCIADO EN Farmacia por la Universidad de Granada
PROGRAMA DE DOCTORADO Bioquímica y Biología Molecular

DEPARTAMENTO RESPONSABLE Bioquímica y Biología Molecular

TITULO DE LA TESIS " Deficit de ácidos grasos poliinsaturados en la cirrosis hepática. Relación con la malnutrición".

DIRECTOR/ES Dr. D. Fermín Sánchez de Medina Contreras

TUTOR Dr. D. José Luis Periago Minguez

TRIBUNAL

PRESIDENTE Ma DOLORES SUAREZ ORTEGA

VOCALES JOSE FERNANDEZ AGUILERA SANCHEZ

MARIA CASCALES ANOSTO

MIGUEL ANGEL GASSULL DURO

SECRETARIO MARGARITA SANCHEZ CAMPOS

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.ª JUANA GONZALEZ GARCIA éste procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, éste le calificó A PTO "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD

Granada 19 Marzo 1990
El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: M. D. SUAREZ

EL VOCAL,

Fdo.: JOSE F. AGUILERA

EL VOCAL,

Fdo.:

EL VOCAL,

Fdo.: M. A. GASSULL DURO

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctora en Farmacia por la Licenciada Dña. Juana González García.

Directores de esta Tesis:

Prof. Dr. D. FERMIN SANCHEZ DE MEDINA CONTRERAS

Prof. Dr. D. JOSE LUIS PERIAGO MINGUEZ

Licenciada Dña. JUANA GONZALEZ GARCIA, aspirante al Grado de Doctora en Farmacia.

Parte de los resultados que se recogen en esta memoria han sido presentados en los siguientes Congresos:

IX Congreso de la ESPEN, Barcelona, 1986

IV Congreso Nacional de la SENPE, Bilbao, 1987

XIV Congreso Nacional de la SEB, Málaga, 1988

V Congreso Nacional de la SENPE, 1988

X Congreso de la ESPEN, Leipzig, 1988

VI Congreso Nacional de la SENPE, Zaragoza, 1989

XIV Congreso de la Asociación Española para el estudio del hígado, Madrid, 1989

Asimismo han sido publicados en las siguientes revistas:

NUTRICION HOSPITALARIA, Vol III, Nº 2. V Congreso Nacional de la SENPE, 1988

CLINICAL NUTRITION, Vol. 7, Special Supplement, August, 1988

JOURNAL OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION, Vol. 13, Nº 1, January-February, 1989, Supplement

GASTROENTEROLOGIA Y HEPATOLOGIA, Vol. 12, Nº 5, Mayo, 1989

Esta memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y en el Departamento de Investigación y Desarrollo de UNIASA durante los cursos, 1986-87, 1987-88, 1988-89 y 1989-90.

Este trabajo ha sido financiado
por UNIASA (Granada)

Quiero mostrar aquí mi agradecimiento a las personas e instituciones que han contribuido a la realización de este trabajo:

D. Fermín Sánchez de Medina Contreras, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Director de esta memoria, quien ha sido ante todo el mejor y más admirado de cuantos profesores he tenido durante la Licenciatura de Farmacia.

D. José Luis Periago Mínguez, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, codirector de esta memoria y amigo, que con sus conocimientos, paciencia y apoyo me ha enseñado entre otras cosas, casi la totalidad de las técnicas experimentales ensayadas durante estos años.

D. Angel Gil Hernández, Director del Departamento de Investigación y Desarrollo de UNIASA, persona emprendedora, inteligente e infatigable que ha contribuido en todo momento con sus conocimientos y útiles consejos.

D. Miguel Angel Gassul y D. Eduardo Cabré, médicos miembros del Servicio de Gastroenterología del Hospital de Bellvitge (Barcelona) durante la realización de este proyecto, quienes han contribuido mediante la valoración nutricional de los pacientes cirróticos y el aporte de las muestras de plasma.

Dña. María Dolores Suárez Ortega, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Directora del mismo durante la realización de este proyecto, quien ha permitido que entrase a formar parte del citado Departamento además de prestarme su ayuda en aquellos momentos en que la he necesitado.

D. Miguel Angel Cuadros, profesor del Departamento de Citología de la Facultad de Ciencias, quien ha contribuido con el estudio histológico de los hígados.

D. José Moreno Carretero, Jefe de Sección de Investigación del Departamento de Investigación y Desarrollo de UNIASA, quien con su amistad, buen humor y consejo ha conseguido que me haya sentido realmente a gusto trabajando en esta empresa.

UNIASA, Empresa que ha financiado el presente proyecto.

Hospital de Bellvitge (Barcelona) donde fueron ingresados los pacientes cirróticos objeto de este estudio.

Miembros de los Departamentos de Investigación de UNIASA y de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, quienes han contribuido con su amistad y ayuda.

Muy especialmente a mis amigos y compañeros Jesús, Julio, María, M^a Carmen, Mavi y Puri, quienes con su amistad, gracia, ayuda y simpatía han hecho que estos años hayan sido más amenos y agradables.

Finalmente, a mis padres, dos seres maravillosos, por su esfuerzo y por todo el cariño que de ellos he recibido, y a mi marido, por el sacrificio, apoyo y paciencia que han supuesto todos estos años.

A todos, MUCHAS GRACIAS por la ayuda prestada en cada momento.

A mi madre

INDICE DE ABREVIATURAS

AGE	Acidos grasos esenciales
AGPI	Acidos grasos poliinsaturados
AGPI-LC	Acidos grasos poliinsaturados de larga cadena
ATP	Adenosin trifosfato
CoA	Coenzima A
C/P	Relación molar colesterol/fósforo lipídico
c.p.m.	Cuentas por minuto
DO	Densidad óptica
d.p.m.	Desintegraciones por minuto
EC	Esteres de colesterol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EHC	Encefalopatía hepática crónica
FL	Fosfolípidos
GOT	Glutamato oxalacetato transaminasa
GPT	Glutamato piruvato transaminasa
GSH	Glutation (forma reducida)
LINO	Relación existente entre el contenido en ácido linoleico (18:2w6) y el contenido en ácido araquidónico (20:4w6)
M	Mitocondria
MAC	Perímetro braquial
MAMC	Perímetro muscular del brazo
MEP	Malnutrición energético-proteica
MONO	Acidos grasos monoinsaturados
MP	Membrana plasmática
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
PG	Prostaglandinas
POPOP	2,2'-p-fenilén-bis-(5-feniloxazol)
PFO	2,5-difeniloxazol
RE	Reticulo endoplasmático
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
SA	Albumina sérica

SAT	Acidos grasos saturados
TG	Triacilglicéridos
TSF	Plieque cutáneo del triceps
TXA	Tromboxanos A
UNID	Indice de insaturación

INDICE

- 1.- INTRODUCCION 14

- 2.- PARTE TEORICA 18
 - 2.1.- ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGPI) 19
 - 2.2.- DEFICIENCIAS EN AGPI 22
 - 2.2.1.- Generalidades 22
 - 2.2.2.- Indice trieno-tetraeno 25
 - 2.2.3.- Deficiencia experimental de AGPI 26
 - 2.3.- ALTERACIONES DE AGPI EN DIVERSOS ESTADOS PATOLOGICOS 26
 - 2.4.- AGPI EN ENFERMEDADES HEPATICAS 28
 - 2.5.- COMPUESTOS QUIMICOS COMO AGENTES HEPATOTOXICOS. SU EMPLEO EN EL DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES 29
 - 2.5.1.- Mecanismos de toxicidad del CCl_4 31

- 3.- MATERIAL Y METODOS 34
 - 3.1.- PACIENTES 35
 - 3.2.- EVALUACION NUTRICIONAL DE LOS PACIENTES CIRROTICOS 36
 - 3.3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION 39
 - 3.4.- ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES 39
 - 3.5.- TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES 39
 - 3.6.- APARATOS 40
 - 3.6.1.- Centrifugación 40
 - 3.6.2.- Cromatografía 40
 - 3.6.3.- Termostatación y gaseo 41
 - 3.6.4.- Espectrofotometría 41
 - 3.6.5.- Medida de radiactividad 41
 - 3.6.6.- Aparatos de medida auxiliar y otros 42
 - 3.7.- REACTIVOS 42
 - 3.8.- OBTENCION DE PLASMA 43

- 3.9.- OBTENCION DE MICROSOMAS HEPATICOS 44
- 3.10.- EXTRACCION LIPIDICA 47
- 3.11.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO LIPIDICO 48
 - 3.11.1.- Preparación de las placas 48
 - 3.11.2.- Aplicación de la muestra 49
 - 3.11.3.- Desarrollo cromatográfico y revelado 49
- 3.12.- METILACION 50
- 3.13.- CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS 51
- 3.14.- DETERMINACION DE FOSFORO TOTAL 52
 - 3.14.1.- Fundamento 52
 - 3.14.2.- Soluciones utilizadas 52
 - 3.14.3.- Técnica 52
 - 3.14.4.- Cálculos 53
- 3.15.- DETERMINACION DE COLESTEROL 55
- 3.16.- RELACION MOLAR COLESTEROL/FOSFORO 56
- 3.17.- DETERMINACION DE PROTEINAS 56
- 3.18.- DETERMINACION DE TRIACILGLICERIDOS 57
- 3.19.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES TRANSAMINASAS 57
- 3.20.- DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES Δ^6 Y Δ^9 DESATURASA 58
 - 3.20.1.- Reacción enzimática 58
 - 3.20.2.- Extracción lipídica 59
 - 3.20.3.- Metilación 60
 - 3.20.4.- Aislamiento y medida del producto de reacción 61
 - 3.20.4.1.- Cromatografía y revelado 61
 - 3.20.4.2.- Medida de la radiactividad 62
 - 3.20.4.3.- Cálculos de actividad 64
- 3.21.- ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS HIGADOS 64
- 3.22.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS 65

- 4.- RESULTADOS 69
 - 4.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CIRROTICOS 70

- 4.1.1.- Parámetros nutricionales 70
- 4.1.2.- Niveles de fósforo lipídico, colesterol y triacilglicéridos en el plasma de los pacientes cirróticos 71
- 4.1.3.- Concentraciones de ácidos grasos plasmáticos 71
- 4.1.4.- Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos 73
- 4.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION 74
 - 4.2.1.- Estudio histológico de los hígados 74
 - 4.2.1.1.- Ratas tratadas con parafina 74
 - 4.2.1.2.- Ratas tratadas con tetracloruro de carbono 75
 - 4.2.2.- Actividades transaminasas (GOT y GPT) 77
 - 4.2.3.- Pesos corporales 77
 - 4.2.4.- Concentraciones de ácidos grasos plasmáticos 78
 - 4.2.5.- Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos 78
 - 4.2.6.- Niveles de colesterol total, libre y esterificado en el plasma de las ratas tratadas con CCl_4 y parafina 79
 - 4.2.7.- Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de microsomas hepáticos de las ratas estudiadas 79
 - 4.2.8.- Relación molar colesterol/fósforo y concentración de colesterol y fósforo en microsomas hepáticos 80
 - 4.2.9.- Actividades Δ^9 y Δ^6 desaturasa 80
- 4.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CON CIRROSIS Y ENCEFALOPATIA HEPATICA CRONICA 81
 - 4.3.1.- Parámetros nutricionales 81

4.3.2.- Ácidos grasos plasmáticos 81

4.3.2.1.- Series w7 y w9 81

4.3.2.2.- Serie w6 82

4.3.2.3.- Serie w3 82

4.4.- TABLAS 83

4.5.- FIGURAS 104

5.- DISCUSION 120

5.1.- PACIENTES CIRROTICOS 121

5.2.- MODELO EXPERIMENTAL 124

5.3.- PACIENTES CON ENCEFALOPATIA HEPATICA CRONICA 128

5.4.- CONSIDERACIONES FINALES 129

6.- CONCLUSIONES 131

7.- BIBLIOGRAFIA 134

1.- INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

La cirrosis hepática constituye actualmente un problema sanitario de primera magnitud. En los últimos años se ha prestado una atención creciente al estudio de los cambios metabólicos de los pacientes cirróticos, especialmente los que se refieren a los hidratos de carbono y proteínas, por su importante papel en la patogenia de la encefalopatía hepática. Más recientemente se han descrito alteraciones del metabolismo lipídico que repercuten en la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana. En algunos de estos pacientes existe un verdadero estado deficitario de ciertos ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de larga cadena, especialmente, ácido araquidónico.

Los AGPI forman parte de estructuras celulares y desempeñan un papel trascendente en el mantenimiento de la fluidez de las membranas, afectando por tanto la actividad de enzimas y receptores. El ácido araquidónico y otros AGPI de 20 átomos de carbono son, además, precursores de prostaglandinas y otros eicosanoides de gran actividad biológica. Por todo ello, la carencia en este tipo de compuestos puede afectar negativamente al paciente cirrótico en muchos aspectos, entre los que merece destacarse la función renal, a la que contribuyen decisivamente algunas prostaglandinas.

Los AGPI de cadena larga derivan de los ácidos grasos esenciales (AGE) a través de su metabolismo hepático por enzimas de elongación y desaturación. Estos procesos requieren una función hepática normal y un adecuado estado nutricional, al mismo tiempo que un aporte suficiente de AGE por la dieta. Nuestro trabajo se ha emprendido con el objeto de dilucidar la contribución de la malnutrición al establecimiento del estado deficitario en AGPI de los cirróticos. Para ello se ha estudiado un grupo importante de pacientes clasificados en varios grupos de acuerdo con su estado nutricional, determinándose cuantitativamente el perfil de ácidos grasos en plasma y fracciones plasmáticas. Al mismo tiempo se ha desarrollado un modelo experimental de degeneración hepática en ratas para iniciar la profundización en el conocimiento de los mecanismos implicados en la instauración del déficit, especialmente a través de la determinación de las enzimas desaturantes.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el estado nutricional es decisivo en la producción del estado deficitario en AGPI, lo que subraya la importancia de la suplementación dietética de estos compuestos a los pacientes cirróticos.

Por otra parte, en el curso de este trabajo se han

estudiado una serie de pacientes con encefalopatía hepática crónica (EHC) que presentaron también un importante déficit en AGPI. Estas alteraciones podrían contribuir a explicar la patogenia de dicha entidad clínica, y los pacientes podrían beneficiarse también de la suplementación con AGPI.

2.- PARTE TEORICA

2.- PARTE TEORICA

2.1.- ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGPI)

Muchos de los AGPI que se encuentran en la naturaleza tienen carácter esencial o son derivados de ácidos grasos esenciales (AGE). Los AGPI de larga cadena (AGPI-LC), tales como araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, etc., desempeñan un papel trascendente en la estructura de las membranas y en el control de la actividad celular (Jeffcoat, 1979; Neelands y Clandinin, 1983; Stubbs y Smith, 1984; Owen, 1984). Estos ácidos grasos provienen de los AGE de la dieta (linoleico y α -linolénico) a través de la actividad de diferentes desaturasas y elongasas tisulares. El ácido linoleico (18:2w6) abunda especialmente en los vegetales

terrestres y es el precursor de los AGPI de la familia w_6 . El ácido α -linolénico (18:3 w_3) es característico -aunque no exclusivo- de las algas marinas, siendo el origen de los AGPI de la familia w_3 (Figura 1). Por eso, las membranas de los animales terrestres son ricas en AGPI del tipo w_6 , especialmente ácido araquidónico (20:4 w_6), mientras que en los peces hay mayor proporción de AGPI del tipo w_3 , fundamentalmente ácido eicosapentaenoico (20:5 w_3) y ácido docosahexaenoico (22:6 w_3).

Es interesante resaltar que las desaturasas y elongasas son enzimas de amplia especificidad que pueden actuar tanto sobre las series derivadas de los ácidos de origen exógeno, linoleico (w_6) y α -linolénico (w_3), como sobre la serie endógena derivada del ácido oleico (w_9). Por ello, en los estados carenciales de AGE aumenta mucho la producción del derivado trienoico de la serie endógena w_9 , mientras que disminuyen los derivados tetra y pentainsaturados de origen exógeno de las series w_6 y w_3 , con el consiguiente aumento del índice trieno/tetraeno, que es de interés diagnóstico (Holman, 1960).

También es destacable la competencia existente entre los ácidos de las diferentes familias por las enzimas desaturantes. La Δ^6 desaturasa aumenta su afinidad con el número de dobles enlaces del sustrato (Brenner y Peluffo, 1966). En la dieta occidental habitual, el linoleico es mucho más abundante, sin embargo, que el α -linolénico, por lo que resulta el sustrato preferente para dicha enzima, predominando, por tanto, los componentes de la serie w_6 , especialmente el ácido araquidónico, en las membranas de las células humanas. Además, el aumento dietario de la relación 18:2 w_6 /18:3 w_3 puede incluso llegar a suprimir la síntesis de los AGPI de la serie w_3 (Brenner y Peluffo, 1966; Putnam y col, 1982; Budowski y Crawford, 1985; Galli y col, 1971; Eddy, 1973).

La Δ^6 desaturasa se inhibe, por otra parte, por los AGPI finales de las series w3 y w6, mientras que la Δ^5 desaturasa se inhibe por un exceso de los precursores exógenos de ambas series (Brenner y Peluffo, 1966; Brenner y col. 1969; Brenner y Peluffo, 1969). Por último, vale la pena subrayar también que los productos finales de la familia w3 (20:5 y 22:6) inhiben competitivamente la actuación de la ciclooxigenasa y de las lipoxigenasas sobre el ácido araquidónico, afectando, por tanto, la síntesis de los eicosanoides de la serie 2 (Budowski y Crawford, 1985).

La formación de eicosanoides a partir de determinados AGPI reviste un interés especial, porque estas sustancias (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos, etc.) tienen una gran actividad biológica y pueden contribuir en gran manera a la modulación de la funcionalidad celular (Samuelson, 1978; Lewis, 1984). Como puede observarse en la Figura 1, los eicosanoides de la serie 1 derivan del ácido eicosatrienoico (20:3w6), los de la serie 2 derivan del ácido eicosatetraenoico (araquidónico, 20:4w6) y los de la serie 3 derivan del ácido eicosapentaenoico (20:5w3). Por lo expuesto anteriormente, los eicosanoides más abundantes son los de la serie 2, aunque pueden aumentar mucho los de la serie 3 cuando la dieta es muy rica en pescado y otros productos marinos. Conviene subrayar que los derivados de las distintas series pueden tener actividades diferentes. Quizá el ejemplo más característico es el de los tromboxanos. En efecto, el tromboxano de la serie 2, derivado del araquidónico, (TXA₂), es un potente agregante plaquetario, mientras que el tromboxano de la serie 3, derivado del ácido eicosapentaenoico, (TXA₃), tiene escasa actividad proagregante sobre las plaquetas, lo que tiene indudables repercusiones fisiopatológicas (Thorngren y Gustafson, 1981).

Los AGPI de mayor longitud e insaturación, especialmente el ácido docosaheptaenoico (22:6w3), abundan en las estructuras nerviosas, como la retina y el cerebro y parecen contribuir decisivamente a su funcionalidad (Galli y Socini, 1983).

2.2.- DEFICIENCIA EN AGPI

2.2.1.- Generalidades

La esencialidad de los AGPI fue puesta de manifiesto por Burr y Burr en (1929) en animales de experimentación y ha sido extensamente documentada después (Mead y Fulco, 1976; Holman, 1966; Sinclair, 1958). Mucho más escasa es la información sobre este tipo de deficiencia en la especie humana. En los años cincuenta se señalaron deficiencias en lactantes alimentados con fórmulas muy pobres en AGE, con síntomas como piel seca y escamosa, eczema, irritabilidad y aumento sustancial en la ingesta calórica (Hansen, 1957; Hansen y col, 1958). Los primeros casos de adultos con este tipo de deficiencia aparecieron en los años setenta como resultado de la alimentación parenteral total sin suplementos de AGE, con síntomas cutáneos de tipo eczema, dificultades para la curación de heridas e irritabilidad (Paulsrud y col, 1972; Fleming y col, 1976; McCarthy y col, 1978; Riella y col, 1975).

De los tres AGPI considerados tradicionalmente como esenciales (linoleico, α -linolénico y araquidónico, antiguo "vitágeno F"), el ácido linoleico ha sido considerado como el más importante por varias razones:

- a) El organismo humano puede sintetizar ácido araquidónico a partir del ácido linoleico de la dieta (Brenner, 1982).

- b) Las cantidades de α -linolénico en la dieta habitual de los países occidentales es muy pequeña y durante mucho tiempo se ha dudado de su esencialidad (Holman y col, 1982).
- c) La aplicación tópica de ácido linoleico puede corregir directamente las alteraciones cutáneas de la deficiencia en AGE (Elias y col, 1980).

Sin embargo, se ha podido constatar recientemente que no se puede reducir el aporte de AGE al ácido linoleico de manera exclusiva, señalándose condiciones diversas en las que se necesitan derivados w_6 de más de 18 átomos de carbono así como ácidos grasos de la serie w_3 .

La esencialidad de los ácidos grasos de la serie w_3 se ha señalado por primera vez para la especie humana por Holman y colaboradores en una niña alimentada por vía parenteral total durante un importante período de tiempo con una fórmula pobre en α -linolénico, aunque rica en ácido linoleico (Holman y col, 1982). Asimismo se han descrito casos semejantes en adultos (Bjerve y col, 1987). Mucho más recientemente Ballabriga y col. han descrito una disminución de $22:6w_3$ en la retina de lactantes con malnutrición proteico-energética severa (Martínez y col, 1988) y Uauy y col. han demostrado alteraciones en el electrorretinograma de los recién nacidos prematuros de muy bajo peso que revierten por suplementación de $22:6w_3$ a la dieta (Uauy y col, 1989).

Por lo que se refiere a los AGPI-LC, su eventual esencialidad nace de los estudios de Brenner y colaboradores sobre el metabolismo de los AGE, que indican una pérdida progresiva de la Δ^6 desaturasa en animales por el envejecimiento (Brenner, 1982; Peluffo y col, 1970). Por otra parte, parece probable que esta enzima no aparezca hasta después del nacimiento. En efecto, está bien establecido que los recién nacidos de los

mamíferos, incluida la especie humana, requieren un cierto aporte de AGPI-LC además de linoleico y α -linolénico. En este sentido, es interesante el hecho de que el contenido en AGPI-LC de la leche materna de distintas especies animales está inversamente relacionado con el grado de madurez del sistema nervioso central en el momento del nacimiento (Crawford y col, 1981), subrayando el papel crucial de estos ácidos en el desarrollo cerebral. Por lo que se refiere al recién nacido humano, y resaltando este mismo aspecto, se ha señalado recientemente que, como cabía esperar, los AGPI-LC son más abundantes en la leche de madres de prematuros (Bitman y col, 1983).

La capacidad de biosintetizar AGPI-LC a partir de precursores exógenos no es tampoco común a todas las especies (Rivers y col, 1976; Sargent y col, 1989) ni quizás a todas las razas humanas (Sinclair, 1981). En estos casos se trata de animales carnívoros o de personas que, como los esquimales, carecen de productos vegetales para su consumo dietético, por lo que reciben en la carne o en el pescado cantidades importantes de AGPI-LC.

Para todas estas situaciones es lógico que los AGE no sean solamente los compuestos de 18 átomos de carbono (linoleico y α -linolénico), que es lo habitual, sino también sus homólogos superiores de 20 átomos de carbono (araquidónico y eicosa-pentaenoico). Esto podría ser particularmente importante en el período neonatal, cuando los AGPI-LC, especialmente los de la serie w3, intervienen de forma crítica en la construcción de membranas del sistema nervioso central (King y col, 1971; Paturneau-Jouas y col, 1982). Como ya hemos indicado, la leche humana contiene cantidades suficientes de AGPI-LC pero esto no es así en muchas fórmulas procedentes de leche de vaca con destino a la alimentación infantil, que carecen de estos AGPI-LC aunque son ricas en ácido linoleico (Paul y Southgate,

1978). Durante los últimos cinco años nuestro grupo de trabajo ha realizado una investigación detallada de los efectos de la composición lipídica de la dieta sobre la composición de ácidos grasos del plasma y de las fracciones lipídicas de la membrana de los hematíes en recién nacidos a término y pretérmino durante el primer mes de vida (DeLucchi y col, 1988; Pita y col (en prensa)_a; Gil y col, 1986; DeLucchi y col, 1987; Gil y col, 1988; Pita y col, 1988; Pita y col (en prensa)_b) confirmando la conveniencia de disminuir la cantidad de linoleico y aumentar las de araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico en dichas fórmulas, así como las ventajas de incluir los mismos nucleótidos que contiene la leche humana, que parecen favorecer de alguna manera la biosíntesis de AGPI-LC.

Por supuesto, el problema es aun más importante en el caso de los prematuros. Por eso se está ensayando en la actualidad el enriquecimiento de las fórmulas en AGPI-LC a base (aunque no exclusivamente) de aceite de pescado hasta casi igualar la composición de la leche humana (Liu y col, 1987; Koletzko y col, 1987). Se ha indicado muy recientemente que este tipo de fórmulas utilizadas en la alimentación del prematuro proporciona una composición en los AGPI de la fracción plasmática de los ésteres de colesterol muy semejante a la que se encuentra con la alimentación materna (Koletzko y col, 1987).

2.2.2.- Índice trieno-tetraeno

Hemos señalado anteriormente que la deficiencia en AGE se ha venido cuantificando tradicionalmente por el índice de Holman (20:3w9/20:4w6) (Holman, 1960). Este autor estableció inicialmente un valor superior a 0.4 para indicar el déficit y posteriormente ha reconsiderado esta cifra para dejarla en un valor superior a solo 0.2 (Holman y col, 1979). Aunque este índice ha demostrado ampliamente su utilidad, debe tenerse en

cuenta que su aplicación solo es adecuada cuando los sistemas metabolizantes hepáticos están intactos. Horrobin y Cunnane han señalado en efecto que la aplicación de este índice sería incorrecta en animales que carecen de δ desaturasa, en la fibrosis quística (donde la enzima es poco activa), en situaciones carenciales de zinc (que es un cofactor de dicha enzima) o en el caso de determinados cánceres donde el sistema enzimático se hace más activo frente al ácido oleico (Horrobin y Cunnane, 1981).

2.2.3.- Deficiencia experimental de AGPI

Debido al importante papel que desempeñan los metabolitos del ácido araquidónico en las reacciones inflamatorias, se ha ensayado con cierto éxito el establecimiento de una situación carencial en AGE en algunos estados patológicos tales como la nefritis inflamatoria del lupus murino, una enfermedad similar al lupus eritematoso sistémico humano. En estos casos parece ser también interesante la suplementación dietética con AGPI de la serie w3, por razones de competencia con la serie w6 (Needleman y col, 1986).

2.3.- ALTERACIONES DE AGPI EN DIVERSOS ESTADOS PATOLOGICOS

Este tema ha sido abordado fundamentalmente por el grupo de Holman (Holman y Johnson, 1981; Holman, 1981; Holman, 1986). Además de las situaciones ya comentadas, Holman ha señalado la existencia de alteraciones en el perfil de los AGPI en plasma o en las fracciones de fosfolípidos y ésteres de colesterol en una serie de enfermedades tales como la acrodermatitis entero-hepática, fibrosis quística, enfermedad de Crhon, cirrosis hepática, alcoholismo, síndrome de Reye, síndrome de Sjögren-Larsson, diabetes mellitus, degeneración neuronal multisistémica.

mica, hipotiroidismo, síndrome hepato-pancreo-renal y síndrome de obesidad de Prader-Willi entre otras. En la mayor parte de los casos las interpretaciones son difíciles y se invocan generalmente razones de malnutrición o fallos metabólicos.

Por otra parte, los trabajos de Horrobin se han centrado especialmente en los casos en los que las alteraciones de los AGPI provienen fundamentalmente de la baja actividad de la Δ^6 desaturasa, por lo que preconiza la utilización dietética del ácido gamma-linolénico (18:3w6), que no necesita dicha enzima para originar ácido araquidónico (Horrobin, 1982). Estas condiciones patológicas incluyen entre otras la diabetes mellitus, alteraciones cíclicas femeninas, enfermedades inmunitarias e inflamatorias como la artritis reumatoide, eczema atópico, alcoholismo y algunos trastornos psiquiátricos.

De todo esto se desprende fácilmente que la determinación en el plasma o sus fracciones de los AGPI puede tener una gran utilidad en el laboratorio clínico. De hecho, los datos podrían tener incluso un valor pronóstico. Así, nuestro grupo de trabajo ha comunicado recientemente los resultados obtenidos en este campo en niños traumatizados sometidos a nutrición parenteral total (Maldonado y col, 1987). Como se ha señalado anteriormente, la nutrición parenteral total exenta de lípidos puede originar una deficiencia en AGPI. En este caso, el problema se agrava por la intensa utilización del ácido araquidónico característica del daño tisular. Los valores de AGPI plasmáticos en estos niños señalan claramente la gravedad e incluso pueden predecir la muerte.

2.4. AGPI EN ENFERMEDADES HEPATICAS

Las primeras investigaciones sobre los niveles plasmáticos de AGPI datan de alrededor del año 1960. Así, Caren y Corbo estudiaron estos niveles en pacientes con cirrosis, fibrosis quística y hepatitis (Caren y Corbo, 1966). Encontraron un aumento de palmítico (16:0), palmitoleico (16:1w7) y oleico (18:1w9) y una disminución de linoleico (18:2w6) y araquidónico (20:4w6) en todas las fracciones plasmáticas, especialmente en los ésteres de colesterol, a la que los autores señalan como más sensible a la enfermedad hepática. Las alteraciones fueron mayores en la cirrosis que en la hepatitis, siendo intermedias en la fibrosis quística, atribuyéndose los cambios en este caso a la cirrosis concomitante. Los autores sugieren que las causas de las alteraciones no son ni la dieta ni la absorción, que no eran defectuosas.

Algunos años más tarde, en 1977, Gunnlaugsson y Berkowitz obtuvieron datos similares en la fracción de ácidos grasos libres del plasma pero atribuyeron los cambios al mal funcionamiento hepático de los pacientes cirróticos (Gunnlaugsson y Berkowitz, 1977). Por otra parte Wilcox, Dunn y Schenker, en 1978, después de obtener datos similares en todas las fracciones plasmáticas de enfermos hepáticos señalaron tanto a la mala absorción como a la disfunción hepática como los factores causantes de las alteraciones del perfil de los ácidos grasos (Wilcox y col, 1978).

Posteriormente, los trabajos del grupo de Holman representan una contribución importante al conocimiento de las alteraciones del perfil de los ácidos grasos plasmáticos en distintos estados patológicos, incluyendo las enfermedades hepáticas (Holman y Johnson, 1981; Holman, 1981; Holman,

1986). Este autor encuentra una disminución generalizada de AGPI de más de 18 carbonos en los fosfolípidos plasmáticos en pacientes cirróticos sin que disminuya el ácido linoleico (18:2w6) por lo que sugiere que el origen de las alteraciones es más metabólico que nutricional y señala la conveniencia de suplementar con ácido araquidónico (20:4w6) la dieta de estos pacientes.

El grupo de Bereziat ha demostrado, por otra parte, un empobrecimiento en araquidónico en las lipoproteínas anormales características de la colestasis así como en los lípidos plasmáticos y plaquetarios de cirróticos (Bereziat y col, 1985). Estos últimos datos han sido confirmados por Owen y col. en las plaquetas (Owen y col, 1981) y eritrocitos (Owen y col, 1982) de enfermos con distintas hepatopatías.

2.5.- COMPUESTOS QUÍMICOS COMO AGENTES HEPATOTÓXICOS. SU EMPLEO EN EL DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES.

Existen en la actualidad una gran cantidad de compuestos químicos de naturaleza diversa que bien de forma directa o bien como consecuencia de su biotransformación actúan como agentes hepatotóxicos. Las alteraciones que inducen, dependen de la naturaleza del tóxico, dosis y vía de administración, idiosincrasia del individuo y medio ambiente, así como de la presencia de otros tóxicos y fármacos que actúan de forma sinérgica potenciando sus efectos.

Entre estos compuestos podemos citar la tioacetamida, etanol, cloroformo, bromotriclorometano y tetracloruro de carbono (Corongiu y col, 1983; Zimmermann y col, 1986; Harris y col, 1982; Shibayama, 1988) que han sido empleados como inductores de cirrosis experimental, siendo entre estos el

CCl₄ el de uso más generalizado.

Paradójicamente el CCl₄ fue ampliamente empleado como anestésico (Jones, 1983) hasta que se pusieron de manifiesto sus efectos hepato y nefrotóxicos. Cameron y Karunaratne (1936) observaron la aparición de necrosis centrilobular e hígado graso tras la administración de CCl₄ a la rata y establecieron las condiciones necesarias para la inducción de la cirrosis:

- a) La dosis debía exceder la dosis mínima hepatotóxica
- b) La administración debía ser de forma continuada y en intervalos cortos para evitar la regeneración del parénquima hepático.

El intervalo de la dosis que puede ser ensayada se puede situar entre 0.033-0.006 ml/Kg de peso que administrados por vía subcutánea es la dosis mínima para que se produzcan cambios histológicos y 0.5 ml/100 g de peso que administrados intraperitonealmente provocan la muerte del animal en unas 5 horas.

La administración intragástrica de 0.25 ml de CCl₄ por 100 g de peso origina la muerte de aproximadamente la 1/3 parte de los hepatocitos (transcurridas 12 horas). El daño es compensado por la regeneración del parénquima hepático que es máxima a las 48 horas de la administración del tóxico y disminuye progresivamente (Smuckler y col, 1976).

Las alteraciones más notables y tempranas se observan primeramente en el retículo endoplasmático, y posteriormente en el núcleo, mitocondria, lisosomas y membrana plasmática apareciendo como un transporte de la alteración del retículo endoplasmático a estos orgánulos (Smuckler y Arcasoy, 1969; Recknagel, 1983a). Probablemente el retículo endoplasmático

es el primero en afectarse ya que contiene la mayoría del citocromo P-450 (Sato y Omura, 1978) y este participa en la biotransformación del CCl_4 en radical triclorometilo ($\cdot\text{CCl}_3$) y otros metabolitos reactivos que se unen covalentemente a proteínas y fosfolípidos.

La propagación de la alteración del retículo endoplásmico a otros orgánulos bien pudiera ser el resultado de una serie de factores cooperativos (Castro y col, 1984; Levy y Brabec, 1984; Castro y Díaz Gómez, 1972; Díaz Gómez y col, 1973; Castro y col, 1973; Díaz Gómez y Castro, 1980; Wirtz, 1974; Añes, 1982):

- a) La existencia en el hepatocito de varios sitios de activación del CCl_4 (retículo endoplasmático, núcleo, mitocondria) de diferente intensidad y consecuencias.
- b) Transporte de proteínas y fosfolípidos alterados desde el retículo endoplasmático a otros orgánulos utilizando los mismos procedimientos que para los componentes no alterados.
- c) La inhibición de la síntesis proteica en el retículo endoplasmático que incide negativamente en la sustitución de proteínas de recambio rápido en los otros orgánulos.

2.5.1.- Mecanismos de toxicidad del CCl_4

La administración de CCl_4 a animales de experimentación origina cambios patológicos como acumulación de triacilglicéridos, disgregación polirribosomal, inhibición de la síntesis proteica, ruptura de la membrana celular y muerte del hepatocito.

Dos mecanismos se propusieron inicialmente para explicar su

acción tóxica. Estos mecanismos no se excluyen mutuamente:

- a) Peroxidación de los lípidos de membrana (Recknagel, 1967; Glende y col, 1976; Benedetti y col, 1977).

La administración de CCl_4 va seguida de disminución en la concentración de citocromo P-450, sugiriendo que el CCl_4 se metaboliza por oxidasas de función mixta del retículo endoplasmático (Castro y col, 1968; Smuckler y col, 1967; Reynolds, 1963). La reacción inicial es la reducción del CCl_4 por el citocromo P-450, originándose Cl y CCl_3 . (Noguchi y col, 1982_a; Noguchi y col, 1982_b; Tomasi y col, 1983; Poyer y col, 1980; Albano y col, 1982). El radical libre $\cdot\text{CCl}_3$ reacciona rápidamente con O_2 para producir el radical peroxitriclorometilo CCl_3O_2 . (Packer y col, 1978), especie muy reactiva con los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico, iniciándose de este modo la peroxidación lipídica (Forni y col, 1983).

- b) Unión covalente de metabolitos derivados del CCl_4 a lípidos y proteínas microsomales.

La disminución del citocromo P-450 ocurre cuando existe peroxidación lipídica pero no metabolismo de hidrocarburos halogenados (Glende y col, 1976) así como por unión covalente del CCl_4 en ausencia de peroxidación lipídica (Musuda, 1981; Yamazoe y col, 1979; Degroot y Haus, 1981). Parece probable la participación de ambos mecanismos en la génesis del daño hepático producido por el CCl_4 . No obstante el conocimiento de los procesos que experimenta el CCl_4 no explica los cambios patológicos que se producen en el hepatocito. Actualmente se hipotetiza una alteración en la homeostasis hepatocelular del Ca^{2+} como origen de las alteraciones patológicas inducidas por el CCl_4 .

En la homeostasis hepática del Ca^{2+} participan 3 mecanismos que mantienen una concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre $0.2 \mu\text{M}$:

- 1) Salida hacia el medio extracelular de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática
- 2) Secuestro de Ca^{2+} por la mitocondria
- 3) Secuestro de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático

Los mecanismos 2 y 3 son sensibles a bajas concentraciones de CCl_4 , aunque la inhibición de ellos vaya acompañada por una elevación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática debido a la funcionalidad de la ATPasa de la membrana plasmática.

Esta última se inhibe reversiblemente por altas concentraciones de CCl_4 lo que se traduce en un aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} (Figura 2). Debemos hacer notar que esta sería la situación que se produciría en los hepatocitos en los que el CCl_4 va alcanzando progresivamente niveles más altos como consecuencia de procesos de difusión y transporte (Brattin y Waller, 1984).

La elevación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática podría afectar a procesos tales como síntesis proteica y secreción lipoproteica. Recientemente se ha puesto de manifiesto que la inhibición en la síntesis proteica coincide con una hipometilación del OH en posición 2' del anillo de ribosa de rRNA citoplasmático (Clawson y col, 1987). Esta hipometilación del rRNA pudiera deberse a la activación de demetilinasas o proteasas que destruyan selectivamente a metilasas rRNA como consecuencia de la elevación citoplasmática de Ca^{2+} .

3.- MATERIAL Y METODOS

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- PACIENTES

El estudio ha sido realizado en pacientes cirróticos con y sin encefalopatía hepática crónica (EHC) y en un grupo control de individuos sanos.

Los pacientes fueron ingresados en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) donde se estableció el diagnóstico de cirrosis hepática por criterios histológicos o, cuando esto no fue posible, por criterios clínico-biológico-gammagráficos. El diagnóstico de EHC fue establecido por criterios clínicos (estado de consciencia, orientación temporoespacial, alteraciones del ritmo del sueño,...).

3.2.- EVALUACION NUTRICIONAL DE LOS PACIENTES CIRROTICOS

Todos los pacientes han sido evaluados nutricionalmente a su ingreso mediante la determinación de tres parámetros sencillos: pliegue cutáneo del tríceps (TSF), perímetro muscular del brazo (MAMC) y albúmina sérica (SA), representativos de la grasa corporal, proteína muscular y proteína visceral, respectivamente. El TSF fue medido con un calibre Holtain (Crosswell, Crymuch, Reino Unido). El perímetro braquial (MAC) se midió con una cinta métrica, y el MAMC se calculó según la fórmula: $MAMC (cm) = MAC (cm) \times TSF (cm)$ (Butterworth y Blackburn, 1976).

Los límites inferiores a la normalidad de cada parámetro coinciden con el valor del quinto percentil de la distribución de valores de dichos parámetros hallada en la población sana del área geográfica servida por el Hospital de Bellvitge (Gassull y col, 1984). Por debajo de este límite se han fijado, de forma arbitraria y convencional, tres intervalos que definen el grado de afectación (leve, moderada, severa) de cada parámetro. Estos valores, expresados en forma de porcentaje de la media de la población sana, se detallan en la Tabla A.

A efectos de este estudio (Abad y col, 1987) se han clasificado los pacientes en tres grupos:

Grupo A: "Estado nutricional 'aceptable'": Incluye el conjunto de pacientes no adscritos a los grupos siguientes.

Grupo B: "Malnutrición energético-proteica 'moderada'":
Cuando el estado nutricional cumpla alguno de los siguientes criterios:

- Afectación severa de la albúmina sérica y leve de los dos

parámetros restantes.

- Afectación severa de la albúmina sérica y moderada de otro parámetro.
- Afectación moderada de dos parámetros y leve del tercero.

Grupo C: "Malnutrición energético-proteica 'severa'": en él se incluyen los pacientes cuyo estado nutricional coincide con uno de los siguientes supuestos:

- Afectación de 2 ó los 3 parámetros de forma severa.
- Afectación severa de 1 parámetro y moderada de los restantes.
- Afectación de los 3 parámetros de forma moderada.
- Afectación severa de un parámetro, moderada de otro y leve del tercero.
- Afectación severa de la proteína muscular y moderada de la albúmina sérica.

TABLA A: Intervalos definitorios de los grados de afectación de cada parámetro, expresados como porcentaje de la media poblacional.

PLIEGUE CUTANEO TRICEPS:

	<u>Leve</u>	<u>Moderado</u>	<u>Severo</u>
Hombres:	35 [•] %-32%	31%-28%	≤ 27%
Mujeres:	51 [•] %-46%	45%-41%	≤ 40%

PERIMETRO MUSC. BRAZO:

	<u>Leve</u>	<u>Moderado</u>	<u>Severo</u>
Hombres:	85 [•] %-77%	76%-69%	≤ 68%
Mujeres:	83 [•] %-75%	74%-67%	≤ 66%

ALBUMINA SERICA:

	<u>Leve</u>	<u>Moderado</u>	<u>Severo</u>
Ambos sexos:	86 [•] %-76%	75%-61%	≤ 60%

(•): Limite inferior de la normalidad = percentil quinto.

3.3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se ha desarrollado un modelo experimental de cirrosis utilizando ratas macho de la raza Wistar, suministradas por el servicio de animales de la Universidad de Granada.

3.4.- ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron colocados en jaulas dotadas de bebederos y comederos suficientemente amplios que permitían una alimentación "ad libitum".

El animalario consistía en una habitación cerrada, ventilada mediante un extractor automatizado e iluminada durante un período de doce horas, coincidente aproximadamente con el natural, temporizado automáticamente. La temperatura se mantuvo entre 22°C y 24°C gracias a un termostato conectado a una fuente de calor.

3.5.- TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

El desarrollo del modelo experimental se ha llevado a cabo en ratas de unos 115 g de peso inicial por tratamiento con CCl₄ (0.15 ml por 100 g de peso de una solución en parafina al 10%, en inyección intraperitoneal tres veces a la semana durante nueve semanas) (El-Dessoukey y col, 1977). Al grupo control se le administró parafina líquida en idénticas condiciones.

Al cabo de este período de tiempo, dichas ratas fueron sacrificadas por decapitación.

3.6.- APARATOS

3.6.1.- Centrifugación

Para la separación del plasma y extracción lipídica se utilizó una centrífuga refrigerada BECKMAN TJ-6.

En la preparación de suspensiones microsomas se utilizó una centrífuga refrigerada BECKMAN J 2-21.

La separación definitiva de microsomas se realizó con una ultracentrífuga BECKMAN L8-70M.

3.6.2.- Cromatografía

La cromatografía en capa fina se realizó en placas de vidrio de 20 x 5 cm y de 3 mm de espesor. Sobre estas placas se extendió, mediante un dispositivo Shandon-Unoplan con posibilidad de regular el espesor de la capa adsorbente, el silicagel preparado.

El transporte de las placas se realizó con un soporte metálico, utilizándose una estufa SELECTA mod. 210 para la activación y un desecador de amplias dimensiones para la conservación de éstas hasta el momento en que fueron usadas.

Las muestras fueron aplicadas con micropipetas de cristal EMIL-WORKS de enrase automático por estrangulamiento.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en cubetas de vidrio de 56 x 56 x 10 cm con tapadera de vidrio ajustada a esmeril, efectuándose el revelado de las placas en una campana saturada con vapores de yodo.

La cromatografía gas-líquido fue realizada en un cromatógrafo HEWLETT-PACKARD modelo 5890A, dotado con detector de ionización de llama y conectado a un integrador HP 3393 A. La columna utilizada, semicapilar de 30 m de longitud y 0.750 mm de diámetro interior, con una fase estacionaria SP-2330 de 0.20 μm de espesor, fue suministrada por TEKNOKROMA (Barcelona).

La inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases se efectuó con microjeringas HAMILTON de 10 microlitros de capacidad.

3.6.3.- Termostatación y gaseo

La metilación y evaporación de las muestras se llevó a cabo en un baño termostatación SELECTA Precis-term (precisión $\pm 1^\circ\text{C}$).

3.6.4.- Espectrofotometría

Las medidas fotocolorimétricas de la concentración de proteínas, colesterol y de triacilglicéridos, así como las de las actividades transaminasas (GOT y GPT), se realizaron en un espectrofotómetro BECKMAN DU-70.

En la determinación fotocolorimétrica de fósforo se utilizó un espectrofotómetro COLEMAN modelo 6/20.

3.6.5.- Medida de radiactividad

La medición de la radiactividad se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido BECKMAN modelo LS-7500, con compensación automática de quenching.

3.6.6.- Aparatos de medida auxiliar y otros

Las pesadas de los reactivos se realizaron en una balanza METTLER H 20 T (Pmax 160 g; error 0.01 mg). Para pesadas que no requerían tanta exactitud se utilizó una balanza SATORIUS (Pmax 160 g; error 0.1 mg). Los animales de experimentación fueron pesados en un granatorio COBOS.

La medida del pH de las soluciones amortiguadoras se llevó a cabo en un pHmetro PHM. 84 Research de la firma RADIOMETER (Copenhague).

Los tubos se agitaron con un vibrador de la firma HEIDOLPH (Alemania).

La homogenización del tejido se realizó en un aparato tipo "potter manual" con pistilo de vidrio esmerilado.

Las muestras se conservaron en un congelador LIEHBER.

Para la adición de pequeñas cantidades de reactivo se utilizaron pipetas automáticas.

Los cortes de los hígados se realizaron en un vibratomo POLARON Watford England. Para la observación de los hígados se utilizó un microscopio PHOTOMICROSCOPE III de la casa ZEISS (Alemania).

3.7.- REACTIVOS

Los reactivos generales procedían de las casas CARLO ERBA (Italia), MERCK (Alemania), PANREAC (España), SIGMA (USA) y BOEHRINGER (Alemania).

La determinación de colesterol se llevó a cabo con un Kit: Monotest-colesterol, método CHOD-PAP de la casa BOEHRINGER (Alemania).

La determinación de triacilglicéridos se llevó a cabo con un Kit: Triglycerides enzymatique trinder de la casa BIOTROL (Francia).

La determinación de las actividades transaminasas (GOT y GPT) se llevó a cabo con un Kit: Test-Combination GOT/GPT de la casa BOEHRINGER (Alemania).

Los gases, N₂, H₂ y aire, de elevado grado de pureza fueron suministrados por OXHIDRICA (Granada).

La mezcla estándar de los esteres metílicos de ácidos grasos procedía de TEKNOKROMA (Barcelona).

Los compuestos radiactivos empleados: ¹⁴C-ácido palmítico (16:0) (actividad específica 58 mCi/mmol, pureza radioquímica 97.1%) y ¹⁴C-ácido linoléico (18:2w6) (actividad específica 59 mCi/mmol, pureza radioquímica 98.8%), procedían de la firma Amersham International (Amersham, Reino Unido).

3.8.- OBTENCION DE PLASMA

La sangre fue depositada en tubos de polietileno heparinizados que se mantuvieron en un baño hielo-agua hasta que fueron centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 2500 rpm; el plasma se recogió con ayuda de una pipeta pasteur siendo congelado y mantenido a -36°C hasta el momento de ser analizado.

3.9.- OBTENCION DE MICROSOMAS HEPATICOS

El procedimiento seguido fue el descrito por Philipp y Shapiro (1979) con ligeras modificaciones. Los animales se sacrificaron por decapitación y se les extrajo rápidamente el hígado que se colocó en solución salina al 0.9% en frío. Los órganos, una vez secos y pesados se trocearon colocándose en tubos de homogenización con tampón fosfato potásico 10 mM pH 6.8, EDTA 2 mM y sacarosa 250 mM* en una proporción de peso tejido/ volumen de tampón 1/3.

La homogenización se llevó a cabo mediante un potter manual con pistilo de vidrio esmerilado. Todos los homogenados se mantuvieron en un baño de hielo fundente hasta que fueron centrifugados.

Los homogenados se sometieron a una centrifugación (Esquema 1) a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C, desechándose los sedimentos; este primer paso tiene por objeto desprenderse de los restos celulares gruesos, mitocondrias, lisosomas y partículas relacionadas.

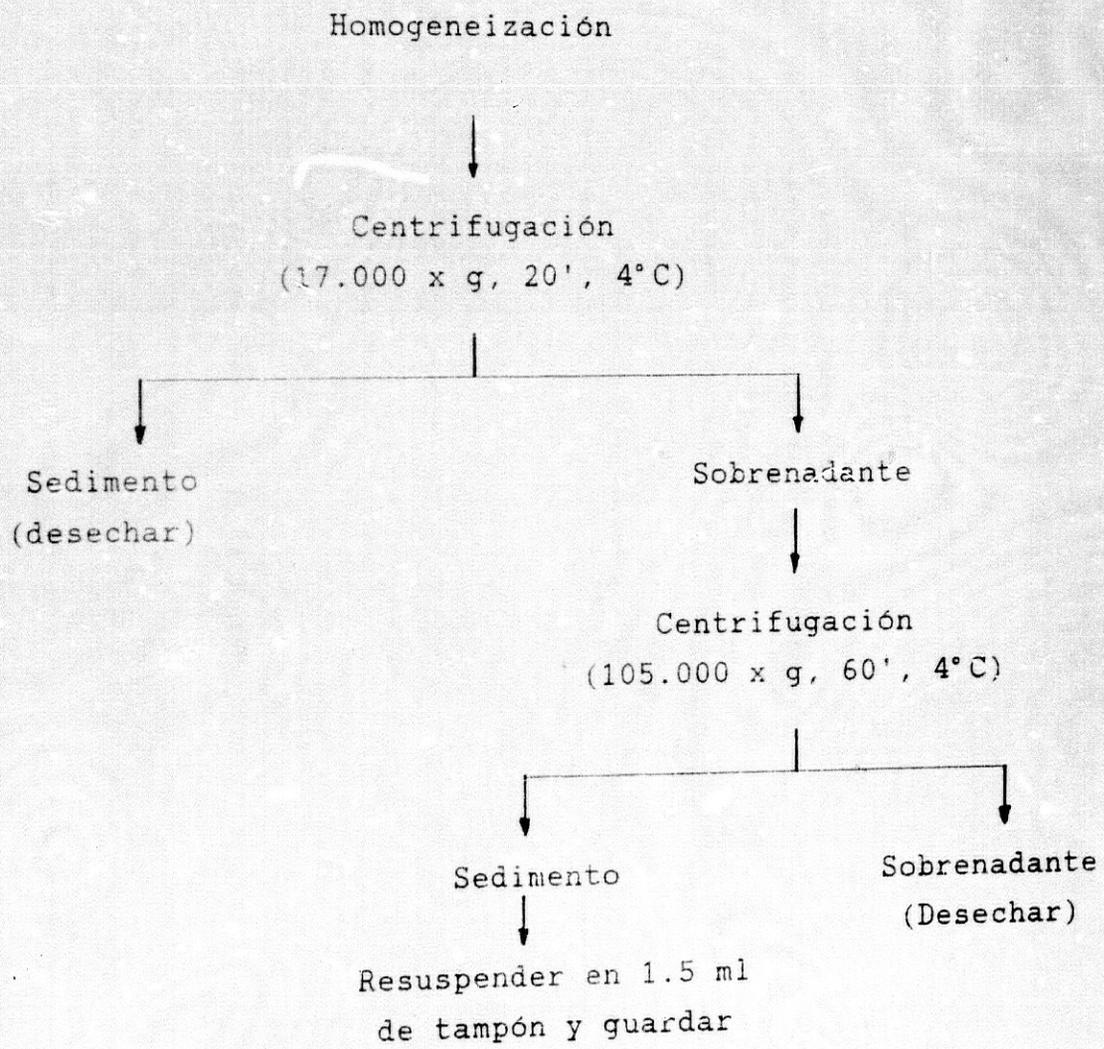
El sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos a 4°C, sedimentando la denominada fracción microsomal integrada fundamentalmente por ribosomas y fragmentos del retículo endoplasmático liso y rugoso y aparato de Golgi.

El sedimento fue resuspendido a 4°C con 1.5 ml del tampón inicial y fue congelado y mantenido a -36°C hasta el momento de ser analizado.

(*) Dado que el EDTA basifica considerablemente el medio, para preparar los tampones se disuelven previamente el EDTA y

los demás componentes en la solución madre ácida hasta conseguir el pH apropiado; posteriormente se enrasa hasta el volumen adecuado con tampón.

ESQUEMA 1



3.10.- EXTRACCION LIPIDICA

El método empleado ha sido el de Folch y col. (1957) ligeramente modificado.

Se tomaron 2 alícuotas de plasma de 0.5 ml cada una, en una de ellas se determinó la concentración de ácidos grasos totales en valores absolutos y en la otra los porcentajes relativos de ácidos grasos de los fosfolípidos, triacilglicéridos y ésteres de colesterol. A la alícuota, donde se pretendía determinar la concentración de ácidos grasos totales, se le adicionó una solución de ácido heptadecanoico (C17:0) (10 mg/ml) en cloroformo de forma que se obtuviese una concentración final de 0.2 mg/ml. Se adicionó este ácido graso como estándar interno porque no fue encontrado en el plasma humano y para permitir la determinación de las concentraciones de ácidos grasos totales en valores absolutos y no solamente en porcentajes relativos; su recuperación fue mayor del 93%. Tanto la solución obtenida como la otra alícuota de 0.5 ml de plasma, fueron tratadas con 5 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) que contenía 50 mg/l de BHT, 1.5 ml de HCl 0.01 N y 0.05 ml de MgCl₂ al 0.5 %, se agitó la mezcla durante un minuto en dos intervalos de 30 segundos y se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 minutos a 4°C.

La mezcla se separó en dos fases entre las cuales se visualiza una capa de proteínas precipitadas. La fase inferior o fase clorofórmica se recoge con ayuda de una pipeta pasteur. La fase superior o fase hidroalcohólica y la interfase proteica, se sometieron a una segunda extracción facilitada por la agitación de la mezcla durante 1 minuto en dos intervalos de 30 segundos, tras los cuales se centrifuga a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C, recogiendo de nuevo la fase inferior con ayuda de una pipeta pasteur.

Las dos fases clorofórmicas se mezclaron y fueron llevadas a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 40°C. El extracto lipídico se mantuvo a -36°C en un tubo cerrado herméticamente y en atmósfera de nitrógeno durante un período no superior a doce horas, tras el cual se llevó a cabo la separación e identificación cromatográfica de los componentes del mismo.

Para la extracción de los lípidos de los microsomas hepáticos se procedió de idéntica forma.

3.11.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO LIPIDICO

3.11.1.- Preparación de las placas

Sobre la plantilla del dispositivo extensor se colocaron 20 placas que se desengrasaron perfectamente con acetona.

La capa adsorbente se preparó mezclando 50 g de silicagel 60G con 100 ml de agua destilada, agitando energicamente la mezcla en un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado durante 1 minuto 30 segundos para conseguir una pasta uniforme y sin grumos. La suspensión se colocó sobre el extensor graduado a 0.5 mm de espesor, extendiéndose rápidamente por las placas que se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para la activación de las placas, se introdujeron en una estufa a 110°C durante 1 hora 15 minutos. Pasado este tiempo se colocaron en un desecador hasta el momento de ser utilizadas.

3.11.2.- Aplicación de la muestra

El extracto lipídico se disolvió en cloroformo en un baño de hielo fundente y se aplicó sobre la placa en forma de pequeñas gotas en disposición horizontal, a 1.5 cm del borde inferior y a 1 cm aproximadamente de los bordes laterales.

3.11.3.- Desarrollo cromatográfico y revelado

La cromatografía de lípidos totales se realizó de acuerdo con Skipski y Barclay (1969) modificando la fase móvil cuya composición fue Hexano: Eter etílico: Acido acético (80:20:1), dejando transcurrir un período de 2 horas antes de introducir las placas con objeto de que la cubeta alcanzase una atmósfera saturada en este líquido de desarrollo; la saturación de la campana fue facilitada al introducir dos tiras de papel de filtro perfectamente adheridas a las paredes.

Una vez saturadas las campanas se introdujeron las placas con el origen hacia abajo y dispuestas lo más verticalmente posible para facilitar el ascenso de la fase móvil. Una vez completado el desarrollo (30 min) se sacaron las placas y se dejaron secar a temperatura ambiente.

En el revelado se usó una campana saturada con vapores de yodo; en ella se introdujeron las placas apareciendo rápidamente las típicas manchas de coloración parda, correspondientes a las distintas fracciones lipídicas; éstas se identificaron según el valor de su Rf. Las fracciones recogidas en el plasma fueron:

Fosfolípidos (FL)	Rf 0.000
Triacilglicéridos (TG)	Rf 0.525
Esteres de colesterol (EC)	Rf 0.675

recogiéndose solo la fracción de fosfolípidos cuando las muestras analizadas correspondían a microsomas hepáticos.

Cada una de las fracciones se delimitó, y una vez eliminado el yodo se procedió a su raspado, conservándose en tubos de metilación herméticamente cerrados y a una temperatura de -36°C hasta su metilación, efectuada en un período de tiempo no superior a 2 horas.

3.12.- METILACION

La metodología seguida en la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos ha sido la descrita por Morrison y Smith (1964), utilizando el compuesto Trifluoruro de boro en metanol al 14% como agente encargado de efectuar la saponificación de los lípidos y la posterior metilación de los ácidos grasos.

A cada una de las fracciones recogidas, contenida en un tubo de metilación, se le adicionó bajo corriente de nitrógeno 1 ml de trifluoruro de boro-metanol al 14%. Los tubos se cerraron herméticamente y se llevaron a un baño a temperatura de ebullición durante 10 minutos. Pasado este tiempo se sacaron los tubos y una vez fríos se les añadió 2 ml de n-hexano y 1 ml de agua destilada. Se agitaron durante 1 minuto en dos intervalos de 30 segundos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación se recogió la fase superior u orgánica con ayuda de una pipeta pasteur, evaporándola bajo corriente de nitrógeno a 40°C .

Las muestras desecadas y perfectamente cerradas, se conservaron a -36°C hasta el momento de ser analizadas por

cromatografía gas-líquido.

3.13.- CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS

Para el análisis cromatográfico se ha utilizado un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890A con una columna semicapilar de 30 m de longitud y 0.750 mm de diámetro interior y con una fase estacionaria SP-2330.

La muestra a analizar fue disuelta en 100 μ l de hexano, inyectándose con ayuda de una microjeringa 1 μ l de la disolución.

Las condiciones de trabajo fueron perfectamente normalizadas, fijándose los flujos de:

Nitrógeno	5 ml/minuto
Hidrógeno	30 ml/minuto
Aire	400 ml/minuto

El programa de temperatura empleado fue el siguiente: una temperatura inicial de 150°C que se mantuvo durante 5 minutos a partir de la cual se aumentó a razón de 2°C/minuto hasta alcanzar 190°C y a razón de 3°C/minuto hasta 211°C.

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos, se preparó un patrón que contenía todos los ésteres metílicos de los ácidos grasos disponibles comercialmente (concentración final 2mg/ml); éstos fueron suministrados por SIGMA Co, St Louis, MO. Para la identificación de los ésteres

metílicos de los ácidos grasos no disponibles comercialmente, se ha utilizado una solución estándar AGPI nº 2 suministrada por TEKNOKROMA.

3.14.- DETERMINACION DE FOSFORO TOTAL

La metodología utilizada fue la descrita por Fiske y Subbarow (1925), modificada por Bartlett (1959).

3.14.1.- Fundamento

El fosfato presente reacciona con el ácido molíbdico para formar el ácido fosfomolíbdico, el cual se reduce selectivamente por adición del ácido 1-amino-2-naftol-3-sulfónico para dar un color azul oscuro cuya intensidad, medida a 830 nm, es proporcional a la cantidad de fósforo presente.

3.14.2.- Soluciones utilizadas

- Solución patrón de fosfato disódico en agua desionizada con una concentración de 10 µl/ml de P.
- Molibdato amónico al 5% (P/V) en H₂SO₄ 2M.
- Reactivo de Fiske-Subbarow: se prepara disolviendo 0.1 g de 1-amino-2-naftol-3-sulfónico, 6 g de metabisulfito sódico y 0.6 g de sulfito sódico anhidro en 50 ml de agua desionizada. Para su perfecta disolución se deja un minuto a baño maría.

3.14.3.- Técnica

Un extracto lipídico obtenido a partir de 0.1 ml de plasma se resuspendió en 200 µl de cloroformo, del que se tomaron dcs

alícuotas de 50 μ l y 100 μ l. La curva patrón se realizó con 0.15, 0.3 y 0.6 ml de la solución patrón de fosfato disódico.

A todos los tubos se les agregó 1.2 ml de ácido perclórico al 70%, dos gotas de molibdato amónico al 5% y se completó hasta 2 ml con agua desionizada. Esta operación se realizó en tubos graduados de 10 ml, lavados con un detergente especial exento de fosfatos. Los tubos se agitaron suavemente con la mano, tapándose con bolas de cristal. A continuación se colocaron en un baño de arena, dejando que la temperatura subiera hasta 180°C, a la cual el ácido perclórico realiza la hidrólisis. El tiempo que debe estar a esta temperatura viene indicado por el momento en que todos los tubos han perdido completamente el color azul (aproximadamente 30 minutos).

Transcurrido este tiempo, los tubos se sacaron del baño de arena y una vez fríos se les añadió 0.4 ml de molibdato amónico al 5% y 0.4 ml del reactivo de Fiske-Subbarow. Los tubos se completaron con agua desionizada hasta 10 ml y se agitaron, colocándolos en un baño a 100°C durante 15 minutos para que apareciera el color azul.

Finalmente, se procedió a su lectura en una espectrofotómetro a 830 nm, utilizando como blanco un tubo con agua desionizada tratada de igual forma.

Cuando se investigó el contenido en fósforo microsomal, el extracto lipídico obtenido procedía de 0.5 ml de la suspensión de microsomas. Este extracto fue resuspendido en 1 ml de cloroformo, tomándose dos alícuotas de 20 y 40 μ l y se procedió de manera idéntica a la descrita anteriormente.

3.14.4.- Cálculos

La cantidad de fósforo lipídico microsomal se determinó por

la fórmula siguiente:

$$F = \frac{D.O.F \times a \times V_1}{V_2 \times V_s \times P}$$

Siendo:

D.O.F: Densidad óptica debida al fósforo.

a: Pendiente de la recta de regresión, obtenida para la curva patrón por el método de mínimos cuadrados en $\mu\text{g/u. D.O.}$

V₁: Volumen del extracto en ml.

V₂: Volumen de la alícuota, en ml, tomado del extracto lipídico utilizado en la colorimetría.

V_s: Volumen en ml de la alícuota tomada de la suspensión de la que se parte.

P: Concentración de proteínas de la suspensión de membranas (mg/ml)

La cantidad de fósforo lipídico plasmático se ueterminó por la fórmula siguiente:

$$F = \frac{D.O.F \times a \times V_1}{V_2 \times V_P}$$

Siendo:

V_P: Volumen de plasma, en ml, del que se parte para la obtención del extracto lipídico.

3.15.- DETERMINACION DE COLESTEROL

Tanto para la determinación de colesterol total como de colesterol libre, se utilizó un test enzimático-colorimétrico (método CHOD-PAP) realizado con un Kit de la casa Böehringer. El Kit de colesterol total (Monotest Colesterol) está basado en el método de Siedel, Schlumberger, Ziegborn y Wahlefed (1981), Stähler y col (1977) y Trinder (1969) y el Kit de colesterol libre (Test-Combination Colesterol libre) está basado en el método de Stähler y col (1977) y Trinder (1969).

Tras la hidrólisis de los ésteres de colesterol en presencia de colesterol esterasa y posterior oxidación del colesterol en presencia de colesterol oxidasa, se origina peróxido de hidrógeno que junto con 4-aminofenazona y fenol y en presencia de una peroxidasa, da lugar a la formación de 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona. Esto nos permite la determinación de la concentración de colesterol total mientras que la ausencia de colesterol esterasa en los reactivos de análisis permite la determinación de colesterol libre.

El contenido en colesterol de los microsomas se determinó sobre un extracto lipídico de 80 μ l de la suspensión microsomal. El extracto lipídico fue disuelto en 20 μ l de isopropanol.

La concentración de ésteres de colesterol plasmáticos se calcularon por diferencia entre los contenidos de colesterol total y libre.

3.16.- RELACION MOLAR COLESTEROL/FOSFORO

El cálculo de la relación molar colesterol/fósforo se determinó según la siguiente expresión:

$$C/F = \frac{C \times P_a}{F \times P_m}$$

Siendo:

C: μ g de colesterol por mg de proteínas.

P_a : Peso atómico del fósforo (30.9)

F: μ g de fósforo total por mg de proteínas.

P_m : Peso molecular del colesterol (388.6)

3.17.- DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración proteica de las suspensiones microsomales, expresada en mg de proteína por ml de suspensión, se determinó mediante el método de Lowry y col (1951), basado en la asociación de las reacciones de Biuret y de Folin. La primera es característica del enlace peptídico y la segunda de los grupos aromáticos de la tirosina y del triptófano.

La solución patrón que se preparó con albúmina bovina, contenía 0.5 mg/ml.

Como paso previo para la determinación, la alícuota de la suspensión microsomal se diluyó con un volumen igual de desoxicolato sódico al 0.2%.

3.18.- DETERMINACION DE TRIACILGLICERIDOS

Para la determinación de triacilglicéridos se ha utilizado un test enzimático-colorimétrico realizado con un Kit de la casa Biotrol (Triglycerides Enzymatique Trinder). Está basado en el método de Bucolo y David (1973) y Esders y Michrina (1979).

Tras la hidrólisis de los triacilglicéridos en presencia de una lipasa y posterior fosforilación y oxidación en presencia de glicerol Kinasa y glicerol-3-fosfato oxidasa, se origina peróxido de hidrógeno que junto con el ácido-3-hidroxi-2,4,6-triidobenzoico y amino-4-antipirina y en presencia de una peroxidasa, da lugar a la formación de Quinoneimina colorada.

3.19.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES TRANSAMINASAS

Para la determinación de las actividades transaminasas (GOT y GPT), se ha utilizado un test colorimétrico (test-Combination GOT/GPT) realizado con un Kit de la casa Boehringer. Está basado en el método de Reitman y Frankel (1957).

Tras la reacción de α -cetoglutarato con L-aspartato en presencia de GOT y con L-alanina en presencia de GPT se forman oxalacetato y piruvato respectivamente. Estos reaccionan con la 2,4-dinitrofenil-hidrazina dando lugar a la formación de hidrazonas cuya concentración se midió fotométricamente.

Se fijó una curva de calibración con una solución estándar de Piruvato suministrada por la casa Boehringer y las D.O se determinaron en un espectrofotómetro a 530 nm.

3.20.- DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES Δ^6 Y Δ^9 DESATURASA

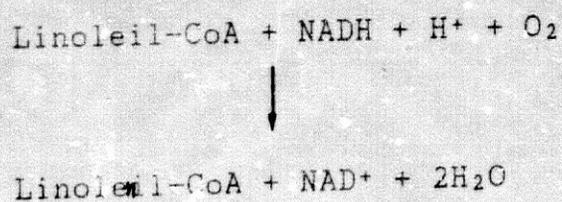
Se ha seguido el método radiactivo descrito por Holloway (1975); Mahfouz y col (1980); Pollard y col (1980); De Schrijver y Privett (1982); Mahfouz y col (1984); Clandinin y col (1985).

3.20.1.- Reacción enzimática

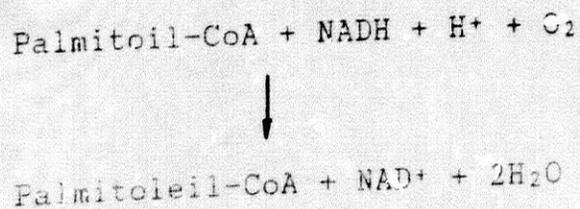
Esta técnica se basa en la conversión de un sustrato marcado en su correspondiente producto.

Mientras que la Δ^6 desaturasa actúa sobre el ácido linoleico dando lugar a la formación de ácido γ -linolénico, la Δ^9 desaturasa actúa sobre el ácido palmítico dando lugar a la formación de ácido palmitoleico. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

- Δ^6 desaturasa



- Δ^9 desaturasa



La mezcla de reacción se preparó por adición, a tubos de tapón de rosca, de las siguientes soluciones y en las concentraciones indicadas: NADH 1.25mM; GSH 1.5mM (protector de los grupos-SH de las proteínas); ATP 5mM y MgCl₂ 5mM (Prasad y Dominick, 1986) (necesarios para la formación del complejo ATP-Mg²⁺); CoA-SH 0.3 mM; y los sustratos radiactivos ¹⁴C-Palmitico 75 µM y ¹⁴C-Linoleico 75 µM, que se usaron en forma de complejos con albúmina (11.5 µg de albúmina por cada µg de ácido graso) (Svensson, 1983).

A continuación, se completó hasta un volumen final de 1 ml con tampón fosfato potásico 0.14 M de pH 7.4 y tampón fosfato potásico 0.14M de pH 7.4 adicionado de EDTA 1mM, sacarosa 0.25 M, GSH 1.5 mM y MgCl₂ 5mM.

Tras la agitación del sistema, se adicionó la suspensión microsomal. Se incubó en un baño a 37°C durante 20 minutos con ligera agitación. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 1 ml de potasa alcohólica al 10%.

Se taparon los tubos con bolas de cristal y se llevaron a baño maría a 100°C durante 30 minutos, con objeto de que se produjera la saponificación total de la muestra. Finalmente, para dejar libres los ácidos grasos para su extracción, se adicionó 1 ml de HCl 4 N a cada tubo.

Los tubos perfectamente cerrados se congelaron a -36°C hasta el momento de su procesamiento.

3.20.2.- Extracción lipídica

Para realizar la extracción lipídica se utilizó una mezcla de cloroformo:metanol (7:3).

A cada tubo de reacción se le adicionaron unas gotas de NaCl a saturación, 0.5 ml de MgCl₂ al 0.5% y 5 ml de cloroformo:metanol (7:3), agitándose la mezcla durante 1 minuto y centrifugando a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos.

La mezcla se separó en dos fases. La fase inferior o fase clorofórmica se recogió con ayuda de una pipeta pasteur. La fase superior se sometió a una segunda extracción con 3 ml de cloroformo: metanol (7:3), y al igual que en la primera extracción, los tubos se agitaron durante un minuto y se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos. Una vez recogida la fase clorofórmica, se mezcló con la anterior y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 40°C.

3.20.3.- Metilación

Antes de realizar la metilación, se añadieron a las muestras 10µl de ácido palmítico (0.2 M en tolueno) y 10 µl de ácido palmitoleico (0.2 M en tolueno) para el caso de la actividad Δ⁹ desaturasa y 10µl de ácido linoleico (0.2M en tolueno) y 10µl de ácido γ-linolénico (0.2M en tolueno) para la actividad Δ⁶ desaturasa. Su adición tiene como objeto la formación de los ésteres metílicos del sustrato y producto de la reacción que sirven como portadores en el desarrollo cromatográfico, ayudando a su visualización en el revelado.

Para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se ha seguido la metodología descrita por Morrison y Smith (1964).

Las muestras desecadas y perfectamente cerradas se conservaron a -36°C hasta el momento de ser analizadas por cromatografía.

3.20.4.- Aislamiento y medida del producto de reacción

3.20.4.1.- Cromatografía y revelado

Los ésteres metílicos del sustrato y producto de la reacción pueden ser separados por cromatografía en capa fina según el método descrito por Sebedio y col (1985) con ligeras modificaciones.

Para la preparación de la fase estacionaria, se colocaron sobre un extensor Shandon-Unoplan 22 placas de vidrio de 5 x 20 cm, perfectamente limpias y desengrasadas. La fase adsorbente se preparó mezclando 33.8 g de Sílica gel 60G, 3.8 g de AgNO_3 (Mahfouz y Holman, 1980; Mahfouz, 1981), 1.2 ml de 2,7-diclorofluoresceína y 77.6 ml de agua destilada. La mezcla se agitó vigorosamente durante 45 segundos y se vertió sobre el dispositivo distribuidor, ajustado para dar un espesor aproximado de 0.5 mm, extendiéndose de manera uniforme sobre las placas.

Con el fin de evitar la reducción del AgNO_3 las placas se dejaron secar en la oscuridad y, posteriormente, se activaron en estufa a 110°C durante 60-90 minutos.

Los ésteres metílicos se resuspendieron en 150 μl de cloroformo en un baño de hielo fundente, utilizando dos placas por muestra. Sobre las placas activadas y a 2 cm del borde inferior, se aplicaron 50 μl de la muestra con ayuda de una micropipeta.

Las placas se introdujeron en cubetas de cromatografía con el origen hacia abajo y lo más verticalmente posible para facilitar el ascenso de la fase móvil. El desarrollo cromatográfico se realizó en la oscuridad.

- Los líquidos de desarrollo utilizados son los siguientes:
- Para determinar la actividad Δ^9 desaturasa se utilizaron 150 ml de cloroformo estabilizado en etanol.
 - Para la determinación de la actividad Δ^6 desaturasa, el líquido de desarrollo fue una mezcla de n-hexano:éter etílico:ácido acético al 10% (70:30:1).

El tiempo de saturación de las cubetas fue de una hora. La saturación de la campana fue facilitada por la introducción de dos tiras de papel de filtro adheridas a las paredes.

Tras el desarrollo cromatográfico (30-40 minutos) se sacaron las placas y se dejaron secar en la oscuridad.

El revelado se realizó directamente a la luz ultravioleta, ya que la incorporación de 2,7-diclorofluoresceína en la fase adsorbente permite la visualización del sustrato y producto de la reacción.

Sobre viales de centelleo se recogieron las bandas correspondientes al origen, producto y sustrato de la reacción. A cada vial se le añadieron 3 ml de líquido de centelleo, agitando a continuación 15 segundos.

El líquido de centelleo se prepara disolviendo 5 g de PPO y 0.3 g de POPOP en 66 ml de acetato de etilo y 34 ml de tolueno, agitando hasta la disolución total. La conservación se realiza en frasco topacio durante no más de 2 o 3 semanas.

3.20.4.2.- Medida de la radiactividad

La radiactividad de los viales se midió en un contador de centelleo líquido.

El principio de la medida de la radiactividad por centelleo líquido consiste en la transformación de la energía cinética,

desprendida en la desintegración de un átomo radiactivo, en energía luminosa con ayuda de moléculas orgánicas que reciben el nombre de centelleadores o fluorógenos (PPO y POPOP). Los fotones de luz emitidos por las moléculas de centelleador son captados por los tubos fotomultiplicadores del aparato, originando impulsos eléctricos detectables (cuentas). La intensidad del impulso es proporcional a la energía de la partícula emitida en la desintegración.

Este método limita su utilización sólo a aquellas muestras que se solubilicen en la solución centelleadora, ya que si no, las radiaciones emitidas por el isótopo no llegan a ser recogidas por los centelleadores y por tanto, no se transforman en energía luminosa. El método es especialmente adecuado para isótopos de baja energía, en los que la radiación emitida es de baja intensidad, de forma que el contacto directo del isótopo radiactivo con el centelleador permite una eficiente transformación de la energía de radiación en energía luminosa.

Las medidas van acompañadas de un error ya que no todas las desintegraciones que se producen durante la medida son captadas por el aparato, debido a que la energía emitida por las partículas puede ser absorbida por moléculas presentes en el medio que son incapaces de excitarse, lo que da lugar al fenómeno de "quenching" o extinción de la muestra.

El cociente entre las cuentas acumuladas durante un minuto (c.p.m.) y las desintegraciones por minuto (d.p.m.) reales de la muestra es la eficiencia de contaje. El objeto de la medida es calcular las d.p.m. o radiactividad absoluta que posee la muestra, ya que ésta es una magnitud independiente del equipo utilizado. No obstante, los aparatos de medida miden sólo c.p.m.. Por ello, es importante conocer la eficiencia de contaje, parámetro que no es necesariamente constante sino que se modifica en función del "quenching".

Nosotros estimamos que el "quenching" de nuestras muestras era constante, por lo que empleamos una eficiencia también constante.

3.20.4.3.- Cálculos de actividad

La actividad enzimática se determinó en función de las d.p.m. de producto de reacción frente al total de radiactividad de los ácidos grasos en la placa. De esta forma y considerando la radiactividad específica del sustrato utilizado, que es conocida, se calculan los nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína. Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{nmoles transformados} = \frac{\text{d.p.m. Producto reacción}}{\text{d.p.m. Producto reacción} + \text{d.p.m. Resto}} \times \text{nmol}$$

$$\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} = \frac{\text{nmoles transformados}}{\text{Tiempo} \times \text{mg Proteinas}}$$

3.21.- ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS HIGADOS

Los hígados fueron fijados durante 2-5 días en una solución neutralizada (pH 7.5) de formol al 5%. Sin realizar ningún tipo de inclusión del material, se realizaron cortes de aproximadamente 15 μm en un vibratomo. Estas secciones se tiñeron en una solución saturada de Negro Sudán B (NSB), para poner de manifiesto los lípidos, y los núcleos se contrastaron con carmin-alumbre.

3.22.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron expresados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$ siendo \bar{X} la media aritmética y SEM los errores estándar de la media.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} X_i}{N} \qquad \text{SEM} = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

donde X_i es el valor de cada uno de los resultados obtenidos, N el número total de valores y S la desviación típica que se calcula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Las comparaciones entre las medias de los parámetros nutricionales, fósforo lipídico, colesterol, triacilglicéridos y concentraciones de ácidos grasos en los distintos grupos de pacientes cirróticos con y sin EHC estudiados y en el grupo control, así como las concentraciones de ácidos grasos en los dos grupos de ratas estudiados, se realizaron por un análisis de varianza simple. La comparación entre dos varianzas se efectuó mediante el valor de F que se obtiene.

$$F = \frac{\text{varianza total entre tratamientos}}{\text{varianza total debido al error}} = \frac{MS_b}{MS_e}$$

donde MS es la media de cuadrados que viene dada por,

$$MS = \frac{SS}{df}$$

siendo SS la suma de cuadrados y df los grados de libertad:

$$SS = \sum_{i=1}^{i=n} X_i^2 - C \quad C = \frac{\left[\sum_{i=1}^{i=n} X_i \right]^2}{N}$$

La varianza total (SS_t) viene dada por:

$$SS_t = SS_b + SS_e$$

Los valores observados de F se han contrastado frente a los valores críticos de F teórico a nivel de probabilidad de 0.05.

En los casos que el análisis de varianza mostró existencia de diferencias significativas entre medias se efectuó un test de t de Scheffé en donde los datos estadísticos estimados han sido:

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / \sqrt{MS_e / (1/N_1 + 1/N_2)}$$

siendo los grados de libertad de este tratamiento estadístico los correspondientes al MS_e . Los valores de la t experimental calculada se han contrastado frente a los valores críticos de una distribución teórica de t de Student a niveles de probabilidad situados entre 0.05 y 0.001.

Todos los cálculos estadísticos se han llevado a cabo en un ordenador Data General Modelo Eclipse, mediante programas de grabación de datos y cálculos desarrollados por los Departamentos de Investigación y de control de UNIASA (Granada).

Para el análisis estadístico de los restantes resultados obtenidos en los animales de experimentación se utilizó un test de t de Student para datos no apareados:

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / S \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}$$

donde \bar{X}_1 y \bar{X}_2 representan los valores medios del parámetro considerado en cada uno de los dos grupos de ratas estudiados; N_1 y N_2 son el número total de muestras en cada grupo; S es la desviación típica estimada conjunta en la hipótesis nula de que los datos obtenidos para ambos grupos de muestra pertenecen a la misma población, y se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$S = \sqrt{\frac{\sigma_1^2 (N_1 - 1) + \sigma_2^2 (N_2 - 2)}{(N_1 + N_2) - 2}}$$

siendo σ_1^2 y σ_2^2 la varianza del parámetro en cada grupo. Los

valores de la t experimental se contrastaron frente a los valores de una distribución teórica de t de Student a niveles de probabilidad entre 0.05 y 0.001.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CIRROTICOS

El estudio ha sido realizado en 92 pacientes cirróticos que en función a su estatus nutricional han sido clasificados en tres grupos: grupos A (estado nutricional aceptable), B (malnutrición energético-proteica moderada) y C (malnutrición energético-proteica severa) constituidos por 38 (41%), 29 (32%) y 25 (27%) pacientes respectivamente y en un grupo control de 50 individuos sanos.

4.1.1.- Parámetros nutricionales

Todos los pacientes han sido evaluados nutricionalmente a

su ingreso al Hospital mediante la determinación de tres parámetros sencillos: pliegue cutáneo del tríceps (TSF), perímetro muscular del brazo (MAMC) y albúmina sérica (SA), representativos de la grasa corporal, proteína muscular y proteína visceral, respectivamente.

En la Tabla 1 se indican los valores medios de los parámetros nutricionales estudiados. El TSF está relacionado con el grado de malnutrición observándose diferencias significativas entre los tres grupos de cirróticos. El MAMC y la SA están disminuidos significativamente en los pacientes con malnutrición energético-proteica (MEP) severa y moderada al compararlos con los pacientes que presentan un estado nutricional aceptable.

4.1.2.- Niveles de fósforo lipídico, colesterol y triacilglicéridos en el plasma de los pacientes cirróticos.

Los resultados obtenidos de fósforo lipídico, colesterol y triacilglicéridos en plasma, se muestran en la Tabla 2. La cirrosis induce bajas concentraciones en fósforo lipídico plasmático y en colesterol total. Se observa que los más afectados son los pacientes con MEP severa. No se han encontrado diferencias significativas para el colesterol total entre los grupos A y B, aunque existe cierta tendencia a estar más bajo en el grupo B. Tanto el colesterol libre como los triacilglicéridos plasmáticos son similares en todos los grupos de cirróticos no habiéndose detectado diferencias con respecto a los controles sanos.

4.1.3.- Concentraciones de ácidos grasos plasmáticos

En la Tabla 3 se indican las concentraciones de ácidos grasos plasmáticos en los pacientes cirróticos en función a su grado de malnutrición.

El total de ácidos grasos saturados disminuye al ir aumentando el grado de malnutrición. Son los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) los compuestos responsables de esta caída.

Los ácidos grasos monoinsaturados aumentan en los pacientes cirróticos con estado nutricional aceptable y con MEP moderada con respecto al grupo control. Sin embargo, los pacientes con MEP severa muestran valores similares a los encontrados en controles sanos. El ácido oleico (18:1w9) presenta un comportamiento similar al descrito para el total de ácidos grasos monoinsaturados. En cambio, el ácido palmitoleico (16:1w7) aumenta de forma similar en todos los pacientes cirróticos.

El ácido linoleico (18:2w6) disminuye progresivamente en los individuos enfermos y sus niveles están inversamente relacionados con el grado de malnutrición (Figura 3). Los AGPI que derivan del ácido linoleico, están significativamente más bajos en los cirróticos que en los controles (Figura 3). La malnutrición induce niveles más bajos de estos ácidos grasos, aunque no existen diferencias significativas entre los pacientes con MEP moderada y severa. El dihomo- γ -linolénico (20:3w6) y araquidónico (20:4w6) son los ácidos grasos más afectados de la serie w6.

Los AGPI de la serie w3 también disminuyen en los pacientes cirróticos, los niveles más bajos se han encontrado en pacientes con MEP severa. El ácido docosahexaenoico (22:6w3) es el ácido graso responsable de esta disminución.

El índice de insaturación (UNID) de los ácidos grasos totales, está disminuido en los pacientes cirróticos, mostrando niveles más bajos aquellos que presentan MEP severa.

4.1.4.- Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos

Los perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos en los distintos grupos de pacientes considerados, se indican en las Tablas 4, 5 y 6.

Generalmente, los niveles de ácidos grasos saturados no se ven afectados en los fosfolípidos de los pacientes cirróticos, sin embargo si muestran un incremento significativo en los ésteres de colesterol. Los ácidos grasos monoinsaturados están más elevados en los pacientes que en los controles sanos en ambas fracciones. No se han encontrado diferencias entre los grupos B y C.

El ácido linoleico (18:2w6) está significativamente más bajo en los ésteres de colesterol de los pacientes cirróticos (Figura 3). Una ligera disminución de este ácido, ha sido observada en los fosfolípidos de los individuos con MEP severa (Figura 3). Los AGPI de la serie w6 disminuyen en ambas fracciones (Figura 3). El dihomio- γ -linolénico (20:3w6) y araquidónico (20:4w6) en los fosfolípidos y el araquidónico en los ésteres de colesterol, son los ácidos grasos responsables de esta disminución. No se han observado grandes diferencias en los niveles de ácido araquidónico al comparar los tres grupos de pacientes cirróticos.

El índice de insaturación (UNID) de fosfolípidos y ésteres de colesterol plasmáticos, se encuentra muy disminuido en los pacientes cirróticos en ambas fracciones. Aquellos pacientes con MEP severa o moderada, muestran los valores más bajos.

Los triacilglicéridos no presentan grandes cambios en su composición en ácidos grasos respecto a la cirrosis y al grado

de malnutrición. Solo el ácido linoleico (18:2w6) está relativamente disminuido en los grupos B y C, mientras que el ácido palmitoleico (16:1w7) está aumentando en todos los grupos de pacientes con respecto a los controles sanos.

4.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

La cirrosis inducida en ratas por tratamiento con CCl_4 ha sido evidenciada analítica e histológicamente. El estudio ha sido realizado en dos grupos de 20 ratas cada uno, a uno se le administró CCl_4 y al otro, grupo Control, se le administró parafina líquida.

4.2.1.- Estudio histológico de los hígados

4.2.1.1.- Ratas tratadas con parafina (Figuras 4 y 5)

Los hígados presentan un aspecto general normal, a excepción de acúmulos de tejido graso en algunas zonas de la cápsula conjuntiva; estos acúmulos no parecen afectar el parénquima hepático.

Al teñir los lípidos con Negro Sudán B (NSB), aparecen principalmente como pequeñas inclusiones, de 1-2 μm , en el citoplasma de los hepatocitos típicamente dispuestos en el borde celular contiguo al sinusoides. En algunos casos los lípidos pueden encontrarse en las células intersticiales (o almacenadoras de grasa) que se disponen entre el hepatocito y el capilar sinusoides; con mucha frecuencia, sin embargo, se aprecia que las inclusiones están en el citoplasma de los hepatocitos.

Menos abundantes son células que contienen gotas de grasa

más voluminosos, hasta 5-6 μm de diámetro. Las más pequeñas de éstas también se disponen sobre todo en la cara sinusoidal, pero las más voluminosas llegan a ocupar casi todo el citoplasma, ocultando a veces el núcleo.

En cuanto a la distribución de los lípidos en el parénquima hepático, se observa que la mayor cantidad de ellos aparece en los hepatocitos de la zona acinar 1 (es decir, en la periferia del lobulillo tradicional, cerca del espacio porta); en la proximidad de la vena terminal (o centrolobulillar) la presencia de células teñidas es menor. Las que se observan en esta zona con frecuencia aparecen aisladas (y entonces suelen contener grandes gotas de lípidos) o formando pequeños grupos.

No se ha observado la tinción de grasa en el espacio extracelular (sobre todo conductos biliares).

4.2.1.2.- Ratas tratadas con tetracloruro de carbono (Figuras 6 y 7)

El tejido hepático aparece mucho menos compacto que en las anteriores, lo que hace más difícil obtener secciones sin que aparezcan roturas; un mayor tiempo de fijación hubiese dado más consistencia al tejido, pero no lo hemos realizado para evitar en lo posible la extracción de lípidos.

En algunas zonas de la cápsula conectiva (y más extendidas que en los tratados con parafina) aparecen masas de tejido adiposo; en las preparaciones histológicas se aprecian voluminosos adipocitos y abundantes núcleos alargados que deben corresponder a fibroblastos.

El parénquima hepático está fuertemente afectado por el tratamiento. Se pueden distinguir zonas en las que aún se reconoce la constitución normal del parénquima, con trabéculas

de hepatocitos bien definidas, y otras en las que se ha producido una intensa necrosis. En las primeras los sinusoides, y en general todos los espacios extracelulares están dilatados. Entre los hepatocitos se observan mitosis y algunas células binucleadas.

Las zonas de degeneración son prominentes por la presencia de grandes glóbulos que se tiñen intensamente con el NSB y que pueden llegar a tener hasta $15\mu\text{m}$ de diámetro. Las zonas de degeneración y las zonas "sanas" presentan un patrón característico de alternancia: en concreto, las zonas de necrosis delimitan a las zonas normales, encerrándolas en un cordón de necrosis. En el centro de las zonas normales se observa el espacio porta; aunque en muchos casos no es fácil comprobar la presencia de sus elementos constitutivos, debido a la distorsión que sufre el tejido por el tratamiento, la observación de la arteria, vena y conducto biliar en bastantes casos y la regularidad de la distribución de la necrosis permite afirmar que la zona más afectada por el tratamiento es la de la vena terminal (zona acinar 3).

Por tanto, las zonas inalteradas corresponden a la zona acinar 1. En las ratas tratadas con parafina se apreciaba en ella la mayor proporción de inclusiones lipídicas, y, de hecho, se observa una apariencia semejante. A medida que se pasa de la zona acinar 1 a la 2-3 se observa un incremento en las gotas lipídicas que van ocupando el citoplasma de los hepatocitos hasta que prácticamente no se aprecian los núcleos. Finalmente las grandes gotas lipídicas aparecen en los espacios extracelulares, en regiones donde no es observable una organización histológica definida. Estas regiones con necrosis intensa siguen el recorrido de la vena terminal: en algunas ocasiones es observable el endotelio de la vena, que aparentemente no se afecta, a pesar de la alteración de las células circundantes. En las zonas con degeneración se

pueden apreciar núcleos más pequeños que los de los hepatocitos y de contorno irregular; pueden corresponder a linfocitos. También se puede encontrar núcleos alargados, con apariencia de fibroblastos, sobre todo en zonas de degeneración próximas a la cápsula conjuntiva.

En las zonas de mayor necrosis, y en células casi completamente ocupadas por gotas de lípidos, se encuentran algunos hepatocitos cuyo núcleo presenta condensaciones de cromatina en su periferia; junto a esto también aparecen cuerpos intensamente teñidos con el carmín y que deben originarse por la fragmentación del núcleo.

En uno de los hígados observados (Figura 8) aparecen zonas en las que el citoplasma de los hepatocitos apenas se tiñe y el núcleo aparece con un carioplasma muy claro en el que resaltan granulos de cromatina intensamente teñidos, principalmente en la periferia nuclear. Se observan abundantes gotas lipídicas.

4.2.2.- Actividades transaminasas (GOT y GPT)

En la Tabla 7 se indican las actividades de las enzimas transaminasas GOT y GPT en U/L. Se observa que ambas actividades se encuentran significativamente más elevadas en las ratas tratadas con CCl_4 .

4.2.3.- Pesos corporales

Los animales fueron pesados al inicio del tratamiento, durante el tratamiento y al final del mismo. Los datos relativos a las medias de los pesos inicial y final se indican en la Tabla 8. Se observa que el incremento de peso experimentando por los animales es significativamente mayor en las ratas tratadas con parafina o grupo control.

4.2.4.- Concentraciones de ácidos grasos plasmáticos

En la Tabla 9 se indican las concentraciones de ácidos grasos plasmáticos expresadas en mg/dl en las ratas tratadas con CCl_4 y en las tratadas con parafina.

No se observan cambios en el total de ácidos grasos saturados al comparar los animales tratados con CCl_4 con el grupo control. Tanto los niveles de ácido palmítico (16:0) como de ácido estearico (18:0) son similares en ambos grupos de animales.

Los niveles de ácidos grasos monoinsaturados son mayores en las ratas tratadas con Cl_4C , siendo los ácidos palmitoleico (16:1w7) y oleico (18:1w9) los responsables de este aumento (Figura 9). Al contrario, tanto el ácido linoleico (18:2w6) como ácido araquidónico (20:4w6) disminuyen significativamente en las ratas con cirrosis inducida.

En lo que respecta a los AGPI de la serie w3, el contenido de ácido docosahexaenoico (22:6w3) es ligeramente menor en las ratas tratadas con Cl_4C .

Asimismo, el índice de insaturación (UNID) de los ácidos grasos totales, está significativamente disminuido en las ratas intoxicadas (Figura 9).

4.2.5.- Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos.

Los perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos en ambos grupos de ratas, se indican en las Tablas 10, 11 y 12.

Los niveles de ácidos grasos saturados están significati-

vamente más elevados en las ratas tratadas con CCl_4 que en las tratadas con parafina. Esto es así en las tres fracciones plasmáticas consideradas. Los responsables de dicho aumento son los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Igual comportamiento presentan los ácidos grasos monoinsaturados representados por los ácidos palmitoleico (16:1w7) y oleico (18:1w9).

El ácido linoleico (18:2w6) está significativamente más bajo en los fosfolípidos y triacilglicéridos de las ratas intoxicadas, no observándose diferencias en los ésteres de colesterol. Los AGPI de la serie w6 disminuyen en las 3 fracciones, siendo el ácido araquidónico (20:4w6) el mayor responsable de dicha disminución.

El índice de insaturación (UNID) de las tres fracciones plasmáticas consideradas, se encuentra muy disminuido en las ratas tratadas con CCl_4 .

4.2.6.- Niveles de colesterol total, libre y esterificado en el plasma de las ratas tratadas con CCl_4 y parafina

Los resultados relativos a estos datos se indican en la Tabla 13. Se observa que las concentraciones en mg/dl de colesterol total, libre y esterificado son significativamente menores en las ratas con cirrosis inducida.

4.2.7.- Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de microsomas hepáticos de las ratas estudiadas

Estos datos se muestran en la Tabla 14. Tras el tratamiento con CCl_4 se observa un aumento del contenido de ácido palmítico (16:0) y una disminución del contenido de ácido esteárico (18:0), no observándose por tanto cambios en los niveles del total de ácidos grasos saturados al comparar ambos grupos

de animales.

Los niveles de ácidos grasos monoinsaturados son significativamente mayores en las ratas tratadas con CCl_4 (Figura 10).

No existen diferencias en el contenido de ácido linoleico (18:2w6) entre los dos grupos de animales estudiados.

Los cambios inducidos por el CCl_4 en los niveles de AGPI de las series w6 (Figura 10) y w3 son diferentes según el ácido graso considerado. El grupo de ratas tratadas con CCl_4 presenta niveles más elevados de 20:3w6, 22:4w6 y 22:6w3 que el grupo control; al contrario ocurre con el ácido araquidónico (20:4w6) que disminuye con el tratamiento con CCl_4 .

El índice de insaturación (UNID) está significativamente más disminuido en las ratas intoxicadas por CCl_4 (Figura 10).

4.2.8.- Relación molar colesterol/fósforo y concentraciones de colesterol y fósforo en microsomas hepáticos

Tras el tratamiento con CCl_4 se observa un aumento de las concentraciones de colesterol y fósforo microsomales mientras que no se aprecia diferencias en la razón molar colesterol/fósforo (Tabla 15).

4.2.9.- Actividades Δ^9 y Δ^6 desaturasa

Las actividades desaturantes Δ^9 y Δ^6 se muestran en la Tabla 16. Se observa que ambas actividades son mayores en las ratas intoxicadas por CCl_4 que en el grupo control.

4.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CON CIRROSIS Y ENCEFALOPATIA HEPATICA CRONICA

El estudio ha sido realizado en 11 pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática crónica (EHC), en 23 pacientes cirróticos con función hepática y estado nutricional similar y en un grupo control de 11 individuos sanos. Mientras los pacientes con EHC tomaron una dieta a base de leche, huevos y verduras suplementada con 60 g de proteína/día, la ingesta proteica de los pacientes sin EHC no estaba limitada.

4.3.1.- Parámetros nutricionales

Todos los pacientes han sido evaluados nutricionalmente a su ingreso al Hospital mediante la determinación de los parámetros TSF, MAMC y SA.

En la Tabla 17 se observa que los valores medios de los parámetros nutricionales estudiados son similares en ambos grupos de pacientes.

4.3.2.- Acidos grasos plasmáticos

4.3.2.1.- Series w7 y w9

En la Tabla 18 se indican las concentraciones de ácidos grasos plasmáticos en mg/dl. Se observa que la concentración de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) está disminuida, y que la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (16:1w7 y 18:1w9) está aumentada en ambos grupos de pacientes cirróticos con respecto a los controles sanos. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la concentración plasmática de estos ácidos grasos entre los pacientes con y sin EHC (Tabla 18).

La composición en ácidos grasos de los triacilglicéridos plasmáticos se refleja en la Tabla 19. El perfil de ácidos grasos saturados y monoinsaturados es semejante al anteriormente indicado, siendo estos ácidos grasos los más abundantes en los triacilglicéridos plasmáticos.

4.3.2.2.- Serie w6

Los niveles plasmáticos de ácido linoleico (18:2w6), precursor de la serie, son menores en los pacientes cirróticos (con o sin EHC) que en los controles sanos (Tabla 18, Figura 11). Asimismo, los niveles de AGPI-LC de la serie w6 se encuentran disminuidos en ambos grupos de pacientes (Tabla 18). La razón araquidónico/linoleico también es menor en los pacientes cirróticos (con o sin EHC) que en los controles sanos.

Los niveles de ácido araquidónico (20:4w6), producto final de la serie, son menores en los pacientes con EHC que en los pacientes sin EHC. Esta diferencia es significativa en los niveles de ácido araquidónico de fosfolípidos y ésteres de colesterol plasmáticos (Tablas 20 y 21, Fig 12).

4.3.2.3.- Serie w3

La concentración plasmática de ácido α -linolénico (18:3w3) es normal en ambos grupos de pacientes (Tabla 18, Fig 11). Sin embargo, mientras que los niveles de ácido eicosa-pentaenoico (20:5w3) son significativamente más bajos en ambos grupos de pacientes con respecto a los controles sanos (Tabla 18, Figura 11), la concentración de ácido docosahexaenoico (22:6w3) solo es significativamente menor en los pacientes con EHC (Tabla 18, Figura 11) respecto a los controles sanos.

En las Tablas 20 y 21 se observa un perfil semejante en los AGPI de la serie w3 de los fosfolípidos y ésteres de colesterol plasmáticos.

4.4. - TABLAS

TABLA 1. Parámetros nutricionales de los tres grupos de pacientes cirróticos estudiados^a.

Parámetro ^b	Grupo A ^c (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
TSF(%)	75.4±5.0	60.9±6.8 ^k	30.3±1.6 ^{kn}
MAMC(%)	104.1±1.9	96.8±2.4 ^k	92.2±3.9 ^k
SA(g/l)	32.7±0.8	24.3±0.9 ^k	24.6±0.8 ^k

^a Los resultados se expresan como la media ±ES

^b TSF, pliegue cutáneo del tríceps; MAMC, perímetro muscular del brazo; SA, albúmina sérica

^c Grupo A, estado nutricional aceptable; Grupo B, malnutrición energético-proteica moderada; Grupo C, malnutrición energético-proteica severa.

^kp<0.01 vs Grupo A

^{kn}p<0.01 vs Grupo B

TABLA 2. Concentraciones plasmáticas de fósforo lipídico, colesterol y triacilglicéridos en pacientes cirróticos con diferente estado nutricional^a.

	Pacientes cirróticos ^b			
	Controles Sanos (n=50)	Grupo A (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
Fósforo lipídico ($\mu\text{g/ml}$)	56.4 \pm 2.0	47.0 \pm 3.0 ^e	42.9 \pm 3.3 ^g	43.3 \pm 5.5 ^e
Colesterol total (mg/dl)	163.1 \pm 6.4	121.4 \pm 6.6 ^g	112.4 \pm 8.2 ^g	87.2 \pm 5.9 ^{g1m}
Colesterol libre (mg/dl)	40.6 \pm 1.7	47.4 \pm 3.3	48.2 \pm 4.0	45.7 \pm 4.3 ^g
Triacilglicéridos (mg/dl)	53.5 \pm 3.5	63.2 \pm 5.3	50.9 \pm 3.5	52.6 \pm 6.6

^a Los resultados se expresan como la media \pm ES

^b Grupos A, B y C indicados en la Tabla 1

^ep < 0.05, ^gp < 0.001 vs Controles sanos

¹p < 0.001 vs Grupo A

^mp < 0.05 vs Grupo B

TABLA 3. Concentración de ácidos grasos plasmáticos en pacientes cirróticos con distinto estado nutricional^a

Acidos Grasos (mg/dl)	Controles sanos (n=50)	Pacientes cirróticos ^b		
		Grupo A (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
16:0	30.0±1.1	29.7±1.5	25.4±1.4 ^{eh}	22.7±1.9 ^{fk}
18:0	14.0±0.5	10.6±0.5 ^g	8.6±0.5 ^{gk}	7.9±0.7 ^{gk}
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	0.3±0.1	0.2±0.1	< 0.2	< 0.2
24:0	< 0.2	< 0.2 ^f	< 0.2	< 0.2
16:1w7	2.2±0.1	5.4±0.4 ^g	5.2±0.4 ^g	4.8±0.6 ^g
18:1w9	28.8±1.2	35.6±2.0 ^f	32.4±1.9	28.2±2.3
20:3w9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:1w9	< 0.2	< 0.2	0.3±0.2 ^e	< 0.2
18:2w6	34.6±1.3	30.6±1.8	24.4±1.9 ^{gh}	19.3±2.0 ^{gl}
18:3w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
20:2w6	0.6±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1 ^f	0.3±0.1 ^f
20:3w5	3.5±0.2	2.9±0.2 ^e	1.9±0.2 ^{gk}	1.6±0.2 ^{gl}
20:4w6	14.0±0.6	10.1±0.6 ^g	7.4±0.6 ^{gk}	7.2±0.8 ^{gk}
22:4w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
2 w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
18:3w3	< 0.2	0.4±0.1 ^f	< 0.2 ^h	< 0.2
20:5w3	0.7±0.1	0.3±0.1 ^g	0.3±0.2 ^e	0.4±0.3
22:5w3	0.4±0.0	0.4±0.1	0.3±0.1	< 0.2 ^{fh}
22:6w3	2.4±0.2	2.5±0.3	1.9±0.4	1.8±0.3 ^h
SAT	44.3±1.5	40.6±1.9	34.2±1.7 ^{gh}	30.8±2.6 ^{gk}
MONO	31.0±1.3	41.2±2.1 ^g	37.9±2.2 ^f	33.0±2.9 ^h
UNID	189.4±6.8	173.2±7.8	137.9±9.6 ^{gk}	120.5±10.8 ^{gl}
LINO	2.6±0.1	3.2±0.2 ^f	3.4±0.2 ^g	2.8±0.2 ^m
w6>18C	18.4±0.8	13.7±0.8 ^g	9.8±0.8 ^{gl}	9.3±1.0 ^{gk}
w3>18C	3.5±0.3	3.2±0.3	2.4±0.6	2.3±0.4 ^e

^a Los resultados se expresan como media del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^b Grupos A, B y C indicados en la Tabla 1.

^{ep} < 0.05, ^{fp} < 0.01, ^{gp} < 0.001 vs Controles sanos

^{hp} < 0.05, ^{kp} < 0.01, ^{lp} < 0.001 vs Grupo A.

^{mp} < 0.05 vs grupo B.

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 4. Composición porcentual en ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos en pacientes cirróticos con distinto estado nutricional^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=50)	Pacientes cirróticos ^b		
		Grupo A (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
16:0	26.6±0.3	27.9±0.9	28.7±0.6 ^f	30.8±0.7 ^{ghm}
18:0	14.3±0.2	12.3±0.3 ^g	11.5±0.4 ^g	11.5±0.5 ^g
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	0.4±0.1	0.5±0.2	0.9±0.2 ^e	0.5±0.2
24:0	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
16:1w7	1.0±0.3	1.6±0.2 ^e	2.1±0.2 ^f	2.3±0.3 ^{gh}
18:1w9	13.9±0.4	17.5±0.5 ^g	20.4±0.7 ^{gk}	19.5±0.7 ^{gh}
20:3w9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:1w9	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
18:2w6	22.0±0.6	22.2±0.7	21.2±0.9	19.7±0.7 ^{eh}
18:3w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
20:2w6	0.7±0.1	0.3±0.1 ^g	0.3±0.1 ^g	0.2±0.1 ^g
20:3w6	3.7±0.1	3.3±0.2 ^e	2.6±0.1 ^{gk}	2.4±0.2 ^{gk}
20:4w6	13.2±0.4	10.5±0.4 ^g	9.2±0.4 ^{gh}	9.7±0.4 ^g
22:4w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
22:5w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
18:3w3	< 0.2	< 0.2	< 0.2	0.3±0.1
20:5w3	0.6±0.1	0.3±0.0 ^g	0.3±0.1 ^e	< 0.2 ^g
22:5w3	0.4±0.0	0.3±0.0	0.2±0.1 ^e	< 0.2 ^{gk}
22:6w3	2.7±0.2	2.8±0.2	1.9±0.3 ^{eh}	2.2±0.3
SAT	41.5±0.3	40.7±0.8	41.1±0.6	43.0±0.7 ^h
MONO	15.0±0.6	19.2±0.6 ^g	22.7±0.9 ^{gk}	21.9±0.8 ^{gh}
UNID	146.7±1.9	137.3±3.2 ^e	126.1±3.5 ^{gh}	124.2±2.8 ^{gk}
LINO	1.7±0.1	2.2±0.1 ^g	2.4±0.2 ^g	2.1±0.1 ^e
w6>18C	17.9±0.4	14.4±0.6 ^g	12.4±0.5 ^{gh}	12.5±0.5 ^{gh}
w3>18C	3.7±0.2	3.4±0.3	2.4±0.4 ^f	2.5±0.4 ^f

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^b Grupos A, B y C indicados en la Tabla 1.

^ep < 0.05, ^fp < 0.01, ^gp < 0.001 vs Controles sanos

^hp < 0.05, ⁱp < 0.01, ^jp < 0.001 vs Grupo A.

^kp < 0.05 vs grupo B.

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como \sum (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 5. Composición porcentual en ácidos grasos de los ésteres de colesterol plasmáticos en pacientes cirróticos con distinto estado nutricional^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=50)	Pacientes cirróticos ^b		
		Grupo A (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
16:0	12.3±0.3	14.7±0.6 ^g	18.0±0.9 ^{gk}	17.8±1.0 ^{gh}
18:0	2.4±0.3	2.1±0.3	4.9±1.1 ^{eh}	3.2±0.7
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	< 0.2	0.2±0.1	1.8±0.7 ^{eh}	0.7±0.2 ^e
24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:1w7	2.7±0.1	6.1±0.5 ^g	8.9±0.6 ^{gl}	8.3±0.8 ^{gh}
18:1w9	22.7±0.4	27.2±0.8 ^g	28.7±1.6 ^g	29.8±1.8 ^g
20:3w9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.	< 0.1	< 0.1
18:2w6	50.0±0.9	41.0±1.2 ^g	32.1±2.5 ^{gk}	33.3±2.3 ^{gk}
18:3w6	0.8±0.3	0.8±0.1	0.6±0.2	0.8±0.3
20:2w6	< 0.2	< 0.1	n.d.	< 0.1
20:3w6	0.5±0.1	0.5±0.1	0.2±0.1 ^{fk}	< 0.2 ^{gk}
20:4w6	7.6±0.2	5.8±0.4 ^g	4.3±0.4 ^{gk}	5.0±0.6 ^g
22:4w6	n.d.	< 0.1	n.d.	n.d.
22:5w6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:3w3	< 0.2	0.7±0.1 ^g	0.3±0.1	0.6±0.3
20:5w3	0.3±0.1	0.4±0.2	0.2±0.1	< 0.2 ^e
22:5w3	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.1
22:6w3	0.3±0.1	< 0.2	< 0.2	< 0.2
SAT	14.8±0.5	17.1±0.8 ^e	24.6±2.1 ^{gk}	21.6±1.6 ^{gh}
MONO	25.4±0.5	33.4±0.9 ^g	37.6±1.5 ^{gk}	38.2±1.9 ^{gh}
UNID	163.7±1.7	148.0±2.7 ^g	124.1±5.3 ^{gl}	130.7±4.7 ^{gk}
LINO	6.9±0.3	7.5±0.6	7.8±0.8	7.0±0.9
w6>18C	9.1±0.4	7.3±0.4 ^f	5.0±0.4 ^{gl}	6.0±0.7 ^g
w3>18C	0.6±0.2	0.5±0.2	0.4±0.2	0.2±0.1 ^e

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^b Grupos A, B y C indicados en la Tabla 1.

^ep < 0.05, ^fp < 0.01, ^gp < 0.001 vs Controles sanos

^hp < 0.05, ^kp < 0.01, ^lp < 0.001 vs Grupo A.

^mp < 0.05 vs grupo B.

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como \sum (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 6. Composición porcentual en ácidos grasos de los triacilglicéridos plasmáticos en pacientes cirróticos con distinto estado nutricional^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=50)	Pacientes cirróticos ^b		
		Grupo A (n=38)	Grupo B (n=29)	Grupo C (n=25)
16:0	23.8±0.4	24.7±0.5	24.8±0.6	25.1±0.6
18:0	5.7±0.3	4.4±0.3 ^f	5.5±0.6	5.8±0.6 ^h
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	0.4±0.2	0.8±0.3	1.1±0.4	0.4±0.1
24:0	n.d.	< 0.1	n.d.	n.d.
16:1w7	4.4±0.2	6.2±0.3 ^g	7.2±0.4 ^{gh}	6.1±0.5 ^f
18:1w9	46.9±0.9	47.1±1.0	47.5±1.2	47.7±1.4
20:3w9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.1
18:2w6	16.9±0.9	14.5±0.9	12.2±1.0 ^g	12.4±1.2 ^f
18:3w6	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.2	0.1±0.1
20:2w6	0.5±0.1	< 0.2 ^f	< 0.2 ^e	0.2±0.1 ^e
20:3w6	< 0.2	< 0.2	< 0.2	0.2±0.1
20:4w6	0.7±0.1	1.0±0.1	0.9±0.2	1.2±0.2
22:4w6	< 0.1	< 0.1	n.d.	< 0.1
22:5w6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:3w3	< 0.2	0.3±0.1	< 0.2 ^h	0.7±0.3
20:5w3	n.d.	< 0.1	< 0.1	n.d.
22:5w3	n.d.	< 0.1	< 0.1	< 0.1
22:6w3	0.1±0.1	0.6±0.4	0.2±0.1	0.2±0.1
SAT	29.9±0.7	30.0±0.6	31.4±0.8	31.2±1.1
MONO	51.3±0.9	53.3±1.0	54.7±1.2 ^e	53.9±1.7
UNID	90.9±1.7	91.8±3.0	85.8±1.7 ^e	87.7±2.2
LINO	7.1±1.3	8.9±1.4	4.6±1.0 ^h	5.5±1.0
w6>18C	1.5±0.3	1.3±0.2	1.3±0.2	1.6±0.3
w3>18C	0.1±0.1	0.6±0.4	0.3±0.1	0.2±0.1

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^b Grupos A, B y C indicados en la Tabla 1.

^ep < 0.05, ^fp < 0.01, ^gp < 0.001 vs Controles sanos

^hp < 0.05, ^kp < 0.01, ^lp < 0.001 vs Grupo A.

^mp < 0.05 vs grupo B.

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 7. Actividades transaminasas (GOT y GPT) en ratas tratadas con CCl₄ y parafina^a

Actividades transaminasas (U/L)	CCl ₄ (n=17)	Parafina (n=14)
GOT	240.6±17.9	96.7±5.8 ^b
GPT	406.2±42.9	18.5±2.4 ^b

^a Los resultados se expresan como la media ± ES.

^bp < 0.001

TABLA 8. Pesos inicial y final de ratas tratadas con CCl_4 y parafina^a

gramos	CCl_4 (n=20)	Parafina (n=20)
Peso inicial	118.0±3.3	115.0±3.5
Peso final	297.2±8.6	331.3±7.7 ^c
Incremento de peso	178.7±6.4	216.0±6.9 ^b

^a Los resultados se expresan como la media ± ES.

^bp < 0.001

^cp < 0.01

TABLA 9. Concentración de ácidos grasos plasmáticos en ratas tratadas con CCl₄ y Parafina^a

Acidos Grasos (mg/dl)	CCl ₄ (n=15)	Parafina (n=15)
16:0	40.6±3.5	36.2±1.7
18:0	15.1±1.7	18.1±0.6
20:0	n.d.	n.d.
22:0	< 0.1	0.1±0.1
24:0	n.d.	n.d.
16:1w7	6.4±0.7	3.2±0.3 ^b
18:1w9	23.3±2.3	20.6±1.3
20:3w9	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.
18:2w6	27.3±1.9	34.4±1.9 ^d
18:3w6	0.9±0.2	0.4±0.1
20:2w6	n.d.	< 0.1
20:3w6	0.7±0.1	0.1±0.1 ^b
20:4w6	28.7±2.2	47.1±2.3 ^b
22:4w6	0.5±0.1	0.4±0.1
22:5w6	n.d.	n.d.
18:3w3	1.0±0.2	0.9±0.1
20:5w3	< 0.1	0.3±0.2
22:5w3	0.6±0.1	0.3±0.1
22:6w3	3.6±0.3	4.1±0.3
SAT	55.8±5.1	54.4±2.2
MONO	29.7±2.9	23.9±1.5
UNID	234.7±17.5	314.0±16.2 ^c
LINO	1.0±0.0	0.7±0.0 ^c
w6>18C	30.9±2.4	48.1±2.6 ^b
w3>18C	4.2±0.4	4.6±0.4

^a Los resultados se expresan como media del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.001

^cp < 0.01

^dp < 0.05

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 10. Composición porcentual en ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos en ratas tratadas con CCl₄ y Parafina^a

Acidos grasos	CCl ₄ (n=10)	Parafina (n=10)
16:0	47.6±0.9	29.7±0.8 ^b
18:0	28.2±0.5	29.8±0.9
20:0	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.
16:1w7	0.1±0.1	0.1±0.0
18:1w9	9.2±0.2	6.7±0.2 ^b
20:3w9	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.
18:2w6	9.0±0.6	12.0±0.4 ^c
18:3w6	n.d.	< 0.1
20:2w6	n.d.	< 0.1
20:3w6	< 0.1	0.1±0.1
20:4w6	4.9±0.6	19.3±1.1 ^b
22:4w6	n.d.	n.d.
22:5w6	n.d.	n.d.
18:3w3	n.d.	n.d.
20:5w3	n.d.	n.d.
22:5w3	n.d.	n.d.
22:6w3	0.9±0.1	2.2±0.2 ^b
SAT	75.8±1.4	59.6±1.4 ^b
MONO	9.3±0.2	6.7±0.2 ^b
UNID	52.5±3.8	121.5±6.0 ^b
LINO	1.9±0.1	0.6±0.0 ^b
w6>18C	5.0±0.6	19.5±1.2 ^b
w3>18C	0.9±0.1	2.2±0.2 ^b

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.001

^cp < 0.01

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 11. Composición porcentual en ácidos grasos de los ésteres de colesterol plasmáticos en ratas tratadas con CCl₄ y Parafina^a

Acidos grasos	CCl ₄ (n=10)	Parafina (n=10)
16:0	19.3±1.8	6.2±0.6 ^b
18:0	4.4±0.5	1.0±0.1 ^b
20:0	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.
16:1w7	4.7±0.3	1.5±0.1 ^b
18:1w9	10.7±1.1	4.6±0.4 ^b
20:5w9	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.
18:2w6	12.1±0.6	11.5±0.6
18:3w6	0.3±0.2	0.7±0.1
20:2w6	1.8±0.8	n.d.
20:3w6	0.2±0.1	0.4±0.1
20:4w6	45.5±2.5	74.0±1.3 ^b
22:4w6	n.d.	n.d.
22:5w6	n.d.	n.d.
18:3w3	0.9±0.4	n.d.
20:5w3	n.d.	< 0.1
22:5w3	n.d.	n.d.
22:6w3	n.d.	n.d.
SAT	23.7±2.1	7.2±0.7 ^b
MONO	15.4±1.3	6.1±0.4 ^b
UNID	229.8±9.7	328.7±4.1 ^b
LINO	0.3±0.0	0.1±0.0
w6>18C	47.8±2.0	75.2±1.3 ^b
w3>18C	n.d.	< 0.1

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.001

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 12. Composición porcentual en ácidos grasos de los triacilglicéridos plasmáticos en ratas tratadas con CCl₄ y Parafina^a

Acidos grasos	CCl ₄ (n=10)	Parafina (n=10)
16:0	35.6±1.2	23.4±1.2 ^b
18:0	7.2±0.9	3.8±0.4 ^c
20:0	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	0.4±0.2
24:0	n.d.	n.d.
16:1w7	4.6±1.7	1.6±0.2
18:1w9	27.1±1.4	26.3±1.3
20:3w9	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.
18:2w6	19.2±1.6	31.1±1.3 ^b
18:3w6	0.1±0.1	0.5±0.1
20:2w6	1.8±0.6	0.4±0.1
20:3w6	< 0.1	0.1±0.0
20:4w6	4.1±0.4	11.5±0.9 ^b
22:4w6	0.1±0.1	n.d.
22:5w6	n.d.	n.d.
18:3w3	< 0.1	0.7±0.2 ^c
20:5w3	< 0.1	0.2±0.1
22:5w3	n.d.	n.d.
22:6w3	n.d.	n.d.
SAT	42.8±1.5	27.6±1.3 ^b
MONO	31.8±1.1	27.9±1.4 ^d
UNID	91.4±3.9	141.8±5.5 ^b
LINO	5.0±0.5	2.8±0.2 ^b
w6>18C	6.1±0.6	12.5±1.1 ^b
w3>18C	< 0.1	0.2±0.1

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.001

^cp < 0.01

^dp < 0.05

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 13. Concentraciones de colesterol total, libre y esterificado en el plasma de ratas tratadas con CCl_4 y parafina^a

mg/dl	CCl_4 (n=10)	Parafina (n=10)
CT	62.3±3.1	85.9±4.5 ^b
CL	17.7±1.8	24.2±1.3 ^c
EC	44.6±2.8	61.6±3.4 ^c

^a Los resultados se expresan como la media ± ES.

^bp < 0.001

^cp < 0.01

TABLA 14. Composición porcentual en ácidos grasos de los fosfolípidos de microsomas hepáticos de ratas tratadas con CCl₄ y Parafina^a

Acidos grasos	CCl ₄ (n=18)	Parafina (n=17)
16:0	23.9±0.4	19.6±0.3 ^b
18:0	22.2±0.3	25.2±0.5 ^b
20:0	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.
16:1w7	0.7±0.0	0.4±0.0 ^b
18:1w9	9.1±0.1	6.7±0.2 ^b
20:3w9	n.d.	n.d.
24:1w9	n.d.	n.d.
18:2w6	11.1±0.3	10.8±0.2
18:3w6	0.2±0.0	< 0.1
20:2w6	0.1±0.0	0.1±0.1
20:3w6	0.9±0.0	0.6±0.1 ^d
20:4w6	24.9±0.4	31.8±0.4 ^b
22:4w6	0.7±0.1	0.2±0.0 ^b
22:5w6	n.d.	n.d.
18:3w3	n.d.	n.d.
20:5w3	n.d.	n.d.
22:5w3	0.7±0.0	0.3±0.0 ^b
22:6w3	5.3±0.2	4.0±0.2 ^b
SAT	46.2±0.5	44.9±0.6
MONO	9.8±0.2	7.1±0.2 ^b
UNID	173.5±2.7	185.2±2.6 ^c
LINO	0.4±0.0	0.3±0.0
w6>18C	26.8±0.4	32.8±0.4 ^b
w3>18C	6.0±0.3	4.4±0.2 ^b

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.001

^cp < 0.01

^dp < 0.05

n.d.: No detectado

SAT: Total de ácidos grasos saturados

MONO: Total de ácidos grasos monoinsaturados

UNID: Índice de insaturación (Calculado como Σ (ácido graso x número de dobles enlaces))

LINO: Relación existente entre los contenidos de 18:2w6 y 20:4w6

w6>18C: Total de AGPI de la serie w6 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

w3>18C: Total de AGPI de la serie w3 con más de 18 átomos de carbono en su cadena

TABLA 15. Relación molar colesterol/fósforo y concentraciones de colesterol y fósforo en microsomas hepáticos de ratas tratadas con CCl₄ y parafina^a

	CCl ₄ (n=15)	Parafina (n=14)
Colesterol (µg/mg de proteína)	28.88±1.69	23.70±0.70 ^d
Fósforo (µg/mg de proteína)	12.40±0.81	9.68±0.78 ^d
Relación molar colesterol/fósforo	0.19±0.01	0.21±0.02

^a Los resultados se expresan como la media ± ES.

^dp < 0.05

TABLA 16. Actividades Δ^9 y Δ^6 desaturasa en ratas tratadas con CCl_4 y parafina^a

Actividades desaturasa ($\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	CCl_4	Parafina
Δ^9	0.35 ± 0.03 (15)	0.17 ± 0.02 (15) ^b
Δ^6	0.44 ± 0.04 (11)	0.10 ± 0.01 (14) ^b

^a Los resultados se expresan como la media \pm ES.

^b_p < 0.001

TABLA 17. Parámetros nutricionales de pacientes cirróticos con y sin EHC^a

Parámetro ^b	sin EHC (n=23)	EHC (n=11)
TSF (%)	64.2±3.8	68.5±6.3
MAMC (%)	103.9±2.3	109.7±4.3
SA (g/l)	31.2±1.1	27.0±1.9

^a Los resultados se expresan como la media ± ES.

^b TSF, pliegue cutáneo del tríceps; MAMC, perímetro muscular del brazo; SA, albúmina sérica.

TABLA 18. Concentración de ácidos grasos plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin EHC y en controles sanos^a

Acidos Grasos (mg/dl)	Controles sanos (n=11)	Pacientes cirróticos	
		sin EHC (n=23)	EHC (n=11)
16:0	32.7±2.3	28.5±2.0	27.0±1.6
18:0	15.5±1.0	10.3±0.8 ^b	11.0±0.7 ^b
16:1w7	2.4±0.2	4.9±0.3 ^b	4.7±0.5 ^b
18:1w9	30.0±3.0	36.2±2.9	34.9±3.2
18:2w6	38.9±3.2	28.9±2.7 ^b	31.8±2.6 ^b
18:3w6	0.4±0.6	< 0.2	0.4±0.1
20:2w6	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1
20:3w6	4.3±0.4	2.5±0.2 ^b	2.1±0.1 ^b
20:4w6	16.6±1.9	9.3±0.8 ^b	6.3±0.6 ^b
18:3w3	0.3±0.1	0.4±0.1	0.5±0.2
20:5w3	0.9±0.1	0.2±0.1 ^b	0.2±0.1 ^b
22:5w3	0.5±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1
22:6w3	3.1±0.4	2.2±0.4	1.0±0.2 ^b

^a Los resultados se expresan como media del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.05 vs Controles sanos

TABLA 19. Composición porcentual en ácidos grasos de los triacilglicéridos plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin EHC y en controles sanos^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=11)	Pacientes cirróticos	
		sin EHC (n=23)	EHC (n=11)
16:0	23.9±1.1	25.1±0.7	24.9±0.8
18:0	6.7±1.0	5.2±0.6	5.6±1.2
16:1w7	4.6±0.4	6.4±0.4 ^b	7.1±0.5 ^b
18:1w9	44.3±2.4	47.5±1.3	47.5±1.8
18:2w6	16.8±2.0	13.1±0.9	13.1±2.3
18:3w6	0.4±0.3	< 0.2	n.d.
20:2w6	1.1±0.6	< 0.2	0.3±0.3
20:3w6	0.2±0.1	< 0.2	< 0.2
20:4w6	1.1±0.3	0.8±0.2	0.3±0.1
18:3w3	< 0.1	0.8±1.3	0.8±1.4
20:5w3	n.d.	n.d.	n.d.
22:5w3	n.d.	n.d.	n.d.
22:6w3	0.5±0.5	0.5±0.5	n.d.

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.05 vs Controles sanos

n.d. No detectado

TABLA 20. Composición porcentual en ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin EHC y en controles sanos^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=11)	Pacientes cirróticos	
		sin EHC (n=23)	EHC (n=11)
16:0	26.3±0.9	27.6±1.3	27.6±0.8
18:0	15.1±0.4	12.5±0.3	14.8±2.1
16:1w7	0.8±0.2	1.9±0.2	5.0±3.0
18:1w9	12.9±0.8	18.9±0.8 ^b	21.6±1.8 ^b
18:2w6	21.5±0.9	21.2±0.9	26.2±1.7 ^b
18:3w6	n.d.	n.d.	n.d.
20:2w6	0.7±0.1	0.2±0.1 ^b	0.3±0.1 ^b
20:3w6	4.0±0.4	3.0±0.2 ^b	2.6±0.1 ^b
20:4w6	13.4±1.2	10.3±0.4 ^b	7.2±0.5 ^{bc}
18:3w3	0.5±0.2	0.8±0.3	0.5±0.2
20:5w3	0.7±0.1	0.2±0.1 ^b	n.d.
22:5w3	0.5±0.1	0.3±0.1	0.4±0.3
22:6w3	2.9±0.5	2.3±0.3	1.1±0.2 ^b

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos = ES

^bp < 0.05 vs Controles sanos

^cp < 0.05 vs cirróticos sin EHC

n.d. No detectado

TABLA 21. Composición porcentual en ácidos grasos de los ésteres de colesterol plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin EHC y en controles sanos^a

Acidos Grasos	Controles sanos (n=11)	Pacientes cirróticos	
		sin EHC (n=23)	EHC (n=11)
16:0	12.7±0.6	16.4±0.9 ^b	15.6±0.9
18:0	2.5±0.7	3.0±0.7	2.9±0.8
16:1w7	3.0±0.2	6.1±0.6 ^b	6.9±0.6 ^b
18:1w9	22.5±1.1	28.1±1.1 ^b	28.0±1.3 ^b
18:2w6	48.7±2.4	38.7±1.7 ^b	40.7±2.2
18:3w6	0.9±0.3	0.7±0.1	0.9±0.2
20:2w6	n.d.	n.d.	n.d.
20:3w6	0.6±0.2	0.5±0.1	0.3±0.1
20:4w6	8.2±1.2	5.3±0.7 ^b	3.0±0.5 ^{bc}
18:3w3	< 0.1	0.7±0.2	0.6±0.3
20:5w3	0.4±0.1	0.4±0.3	< 0.1
22:5w3	n.d.	n.d.	n.d.
22:6w3	0.3±0.2	n.d.	n.d.

^a Los resultados se expresan como media de los porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos ± ES

^bp < 0.05 vs Controles sanos

^cp < 0.05 vs cirróticos sin EHC

n.d. No detectado

4.5.- FIGURAS

FIGURA 1. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en el hombre

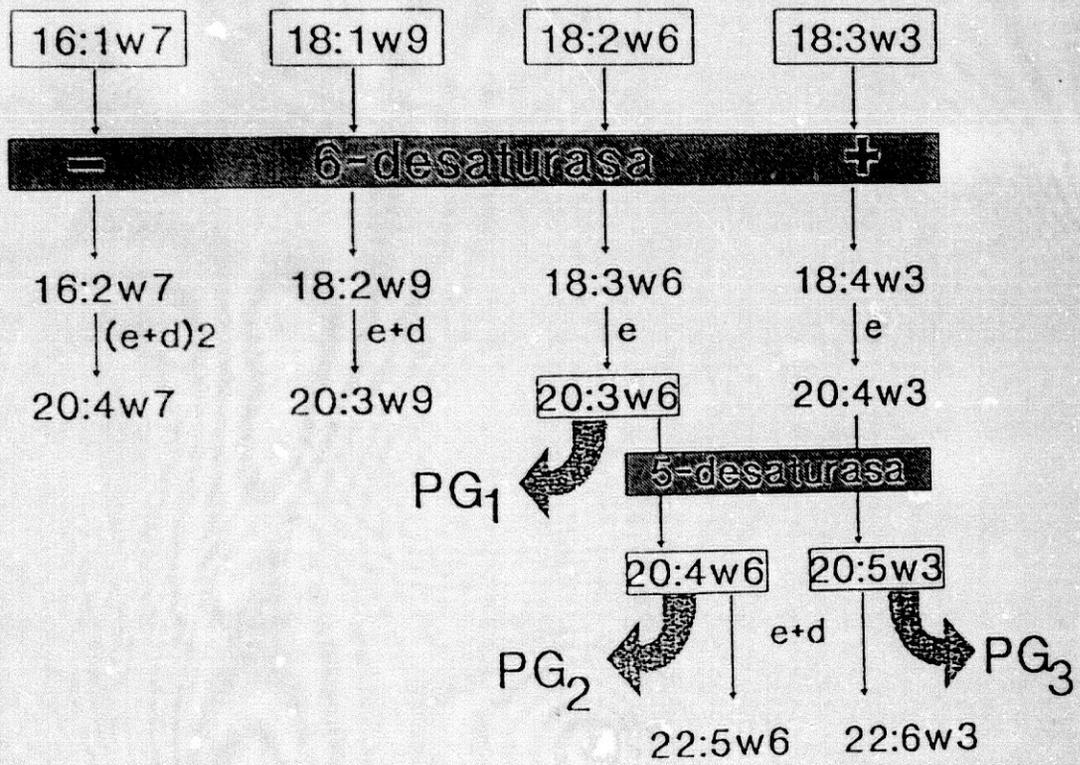
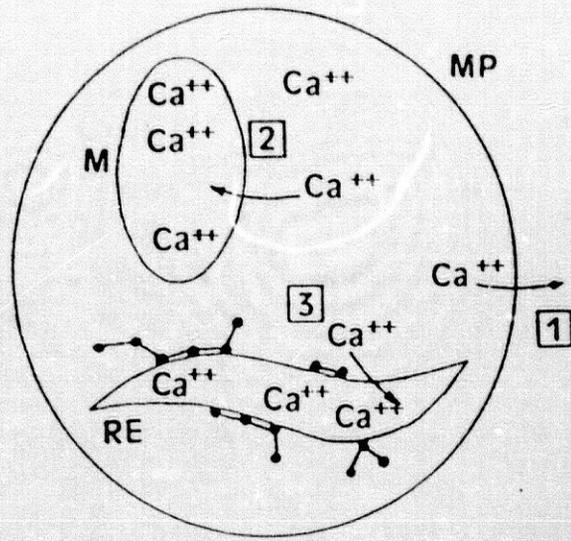


FIGURA 2. Alteraciones en la homeostasis hepática del Ca^{2+} inducidas por el CCl_4 .

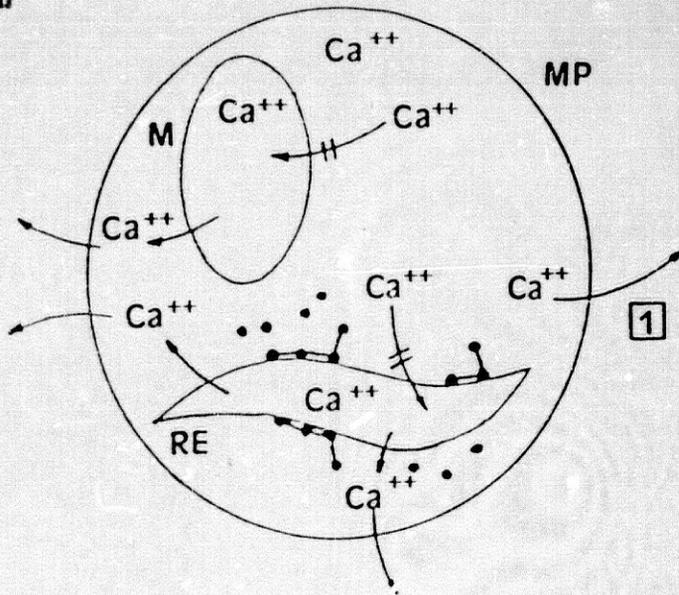
- a. Situación normal. Las flechas describen los mecanismos reguladores del Ca^{2+} citosólico en los hepatocitos. 1: Salida hacia el medio extracelular de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (MP). 2: Secuestro de Ca^{2+} por la mitocondria (M). 3: Secuestro de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático (RE). Los polisomas se encuentran intactos y unidos a la membrana del retículo endoplasmático.
- b. Bajas concentraciones de CCl_4 . Los mecanismos 2 y 3 de secuestro de Ca^{2+} están bloqueados, el flujo de Ca^{2+} se produce desde el retículo endoplasmático y desde la mitocondria hacia el citosol. Se produce una elevación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático debido a la funcionalidad de la ATPasa de la membrana plasmática. Los polisomas se dispersan y la síntesis proteica se para.
- c. Elevadas concentraciones de CCl_4 . La ATPasa de la membrana plasmática es inhibida dejando de salir Ca^{2+} hacia el medio extracelular. Los polisomas se disocian totalmente del retículo endoplasmático. Se produce un aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} .

FIGURA 2

a



b



c

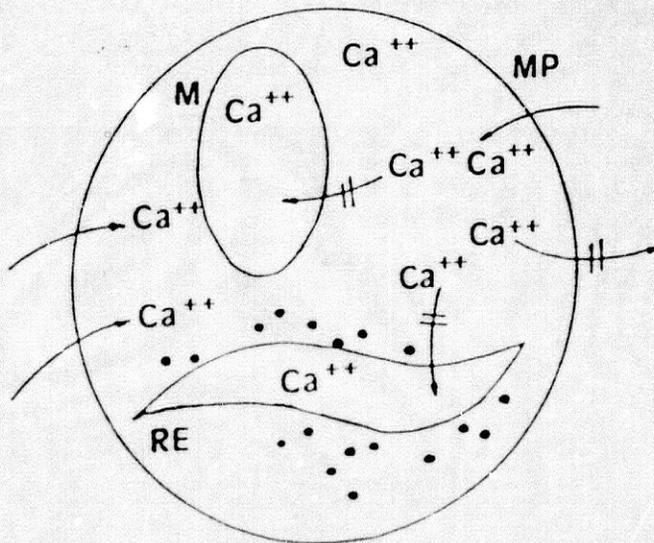


FIGURA 3. Concentraciones plasmáticas de ácido linoleico (18:2w6) y de ácidos grasos poliinsaturados de la serie w6 mayores de 18 átomos de carbono (AGPIw6>18C) y composición porcentual en estos ácidos de los fosfolípidos plasmáticos (FL) y de los ésteres de colesterol plasmáticos (EC) en los pacientes cirróticos con diferente estado nutricional.

Grupo A: estado nutricional aceptable

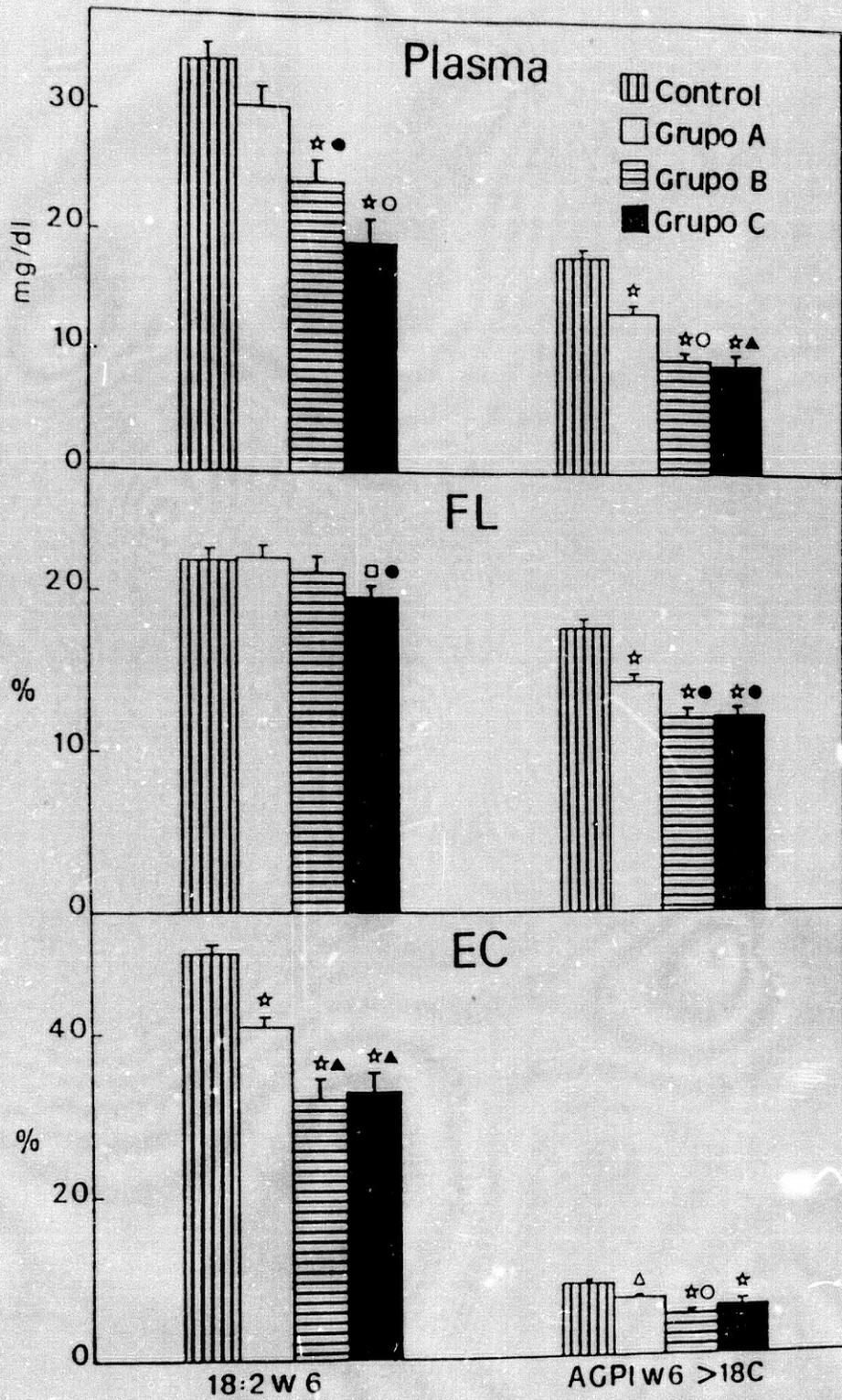
Grupo B: malnutrición energético proteica moderada

Grupo C: malnutrición energético proteica severa

□p<0.05, Δp<0.01, ★p<0.001 vs Controles sanos

●p<0.05, ▲p<0.01, ○p<0.001 vs Grupo A

FIGURA 3



FIGURAS 4 y 5.

Cortes histológicos de los hígados de ratas tratadas con parafina líquida durante 9 semanas.

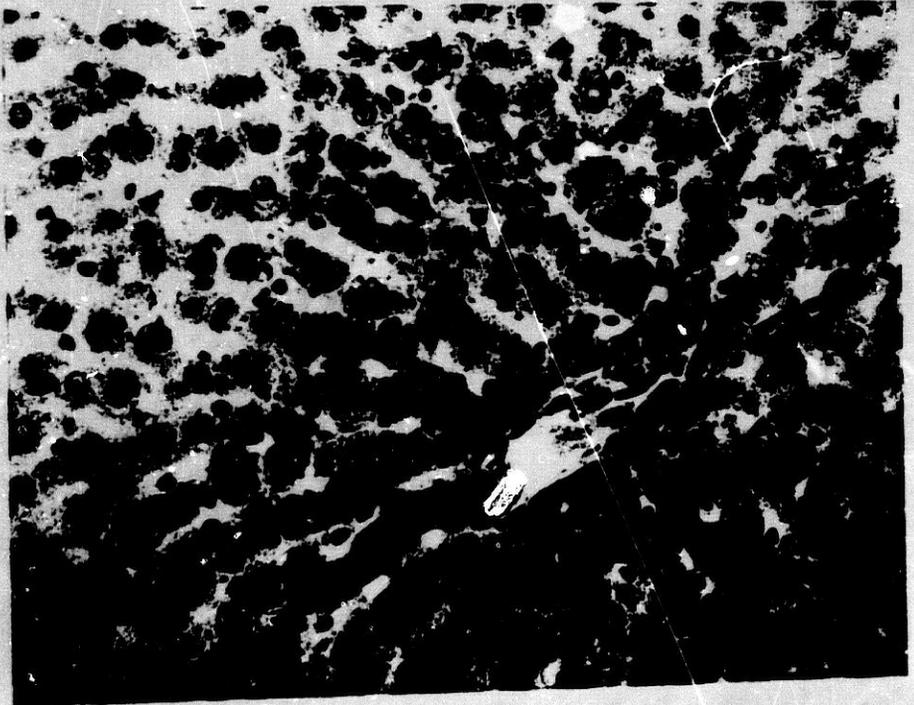
FIGURA 4. Aspecto del parénquima. Las inclusiones lipídicas se sitúan principalmente en la cara sinusoidal del hepatocito.

FIGURA 5. Hepatocitos con inclusiones lipídicas en las proximidades de un espacio porta.

FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURAS 6, 7 y 8.

Cortes histológicos de los hígados de ratas tratadas con CCl_4 durante 9 semanas.

FIGURA 6. Zona de intensa necrosis en la que aparecen núcleos intensamente teñidos que pueden pertenecer a linfocitos.

FIGURA 7. Región periférica del hígado: se observa la cápsula conectiva engrosada y la degeneración que sigue el recorrido de la vena centrolobulillar. Se observa infiltración de células conectivas.

FIGURA 8. Se aprecia una porción de parénquima que ha perdido las características tintoriales normales y que contiene abundantes gotas lipídicas. Los núcleos presentan un carioplasma muy claro y la cromatina se condensa en grumos, sobre todo en la periferia nuclear; el citoplasma apenas se tiñe.

FIGURA 6

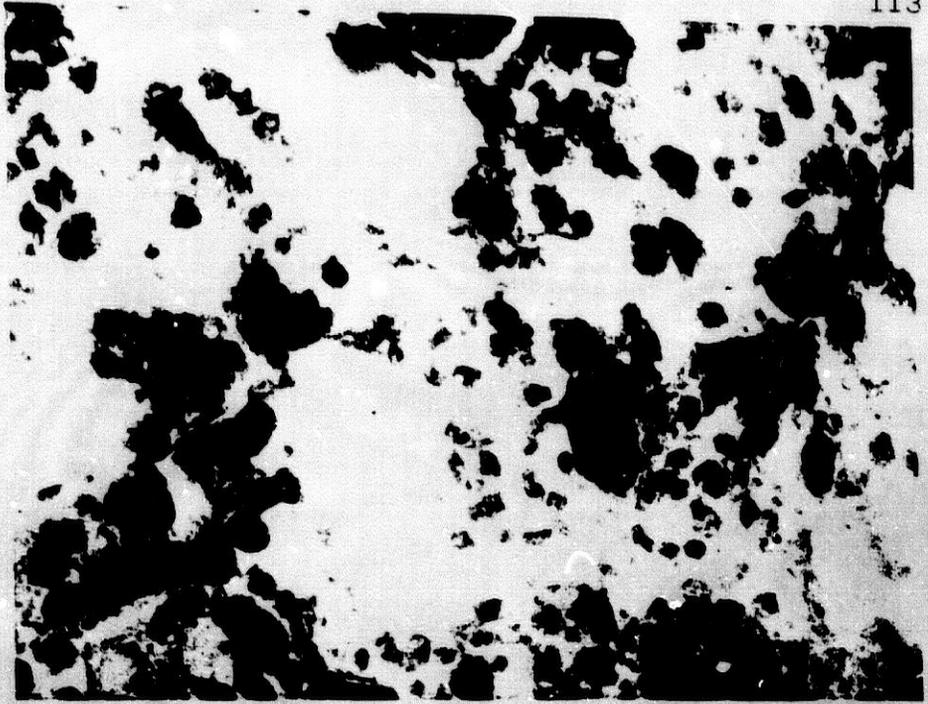


FIGURA 7

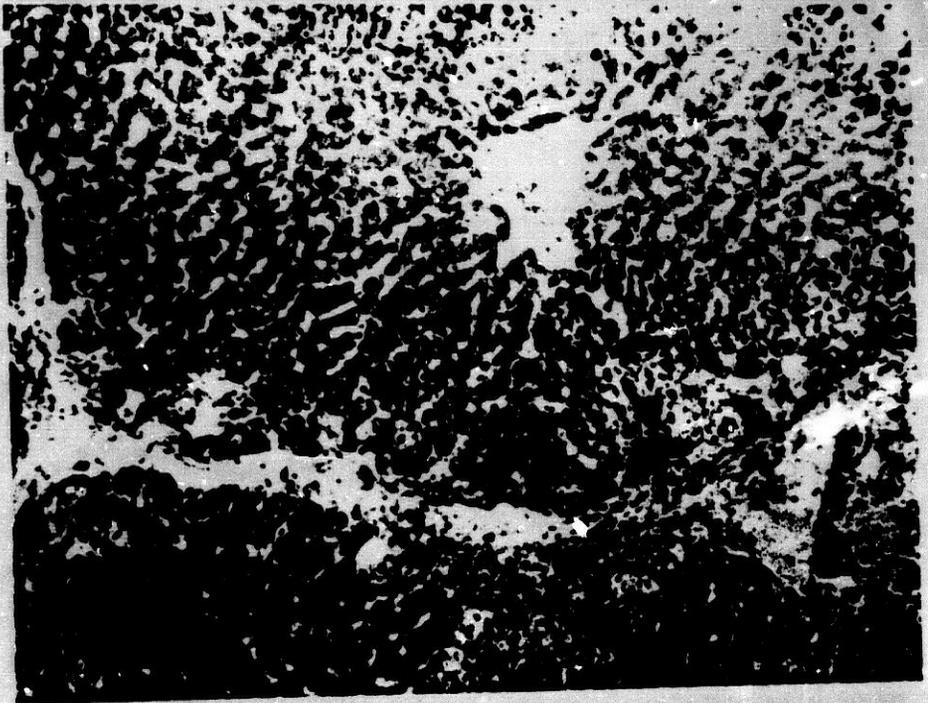
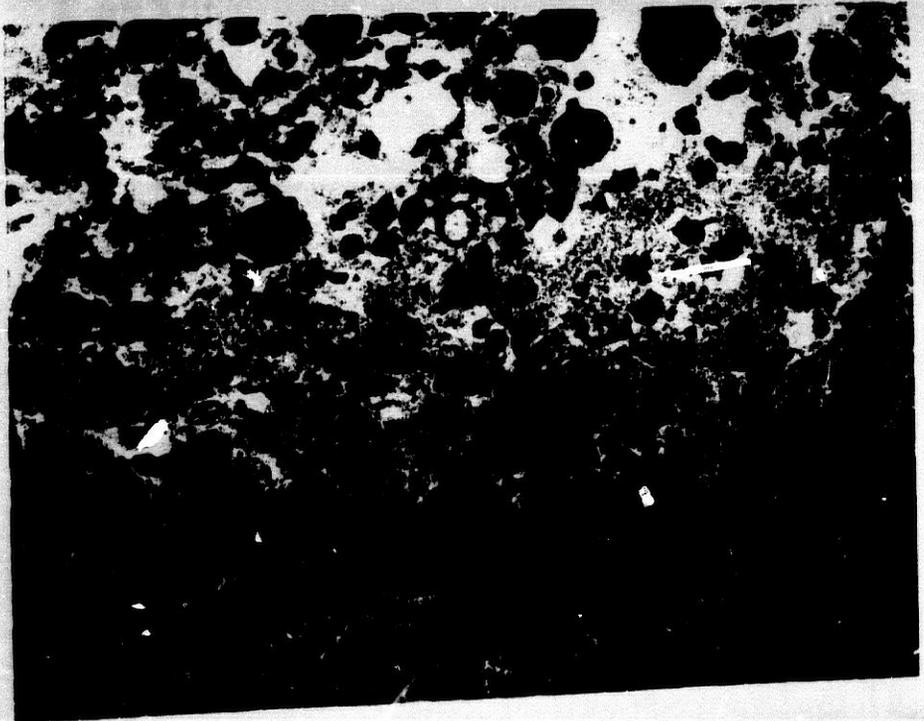


FIGURA 8



FIGURAS 9 y 10

FIGURA 9. Concentración plasmática de ácidos grasos monoinsaturados (MONO) y ácidos grasos poliinsaturados de la serie w_6 mayores de 18 átomos de carbono (AGPI $w_6 > 18C$) e índice de insaturación (UNID) en ratas tratadas con CCl_4 y parafina.

FIGURA 10. Composición porcentual en ácidos grasos monoinsaturados (MONO) y ácidos grasos poliinsaturados de la serie w_6 mayores de 18 átomos de carbono (AGPI $w_6 > 18C$) e índice de insaturación (UNID) de los fosfolípidos de microsomas hepáticos de ratas tratadas con CCl_4 y parafina.

* $p < 0.001$

○ $p < 0.01$

FIGURA 9

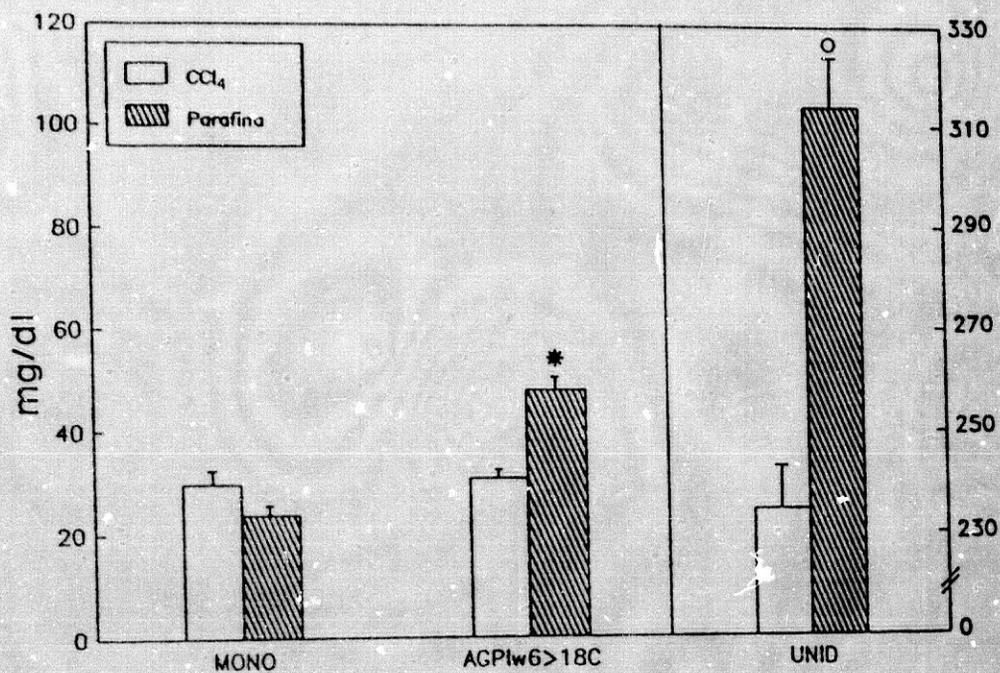


FIGURA 10

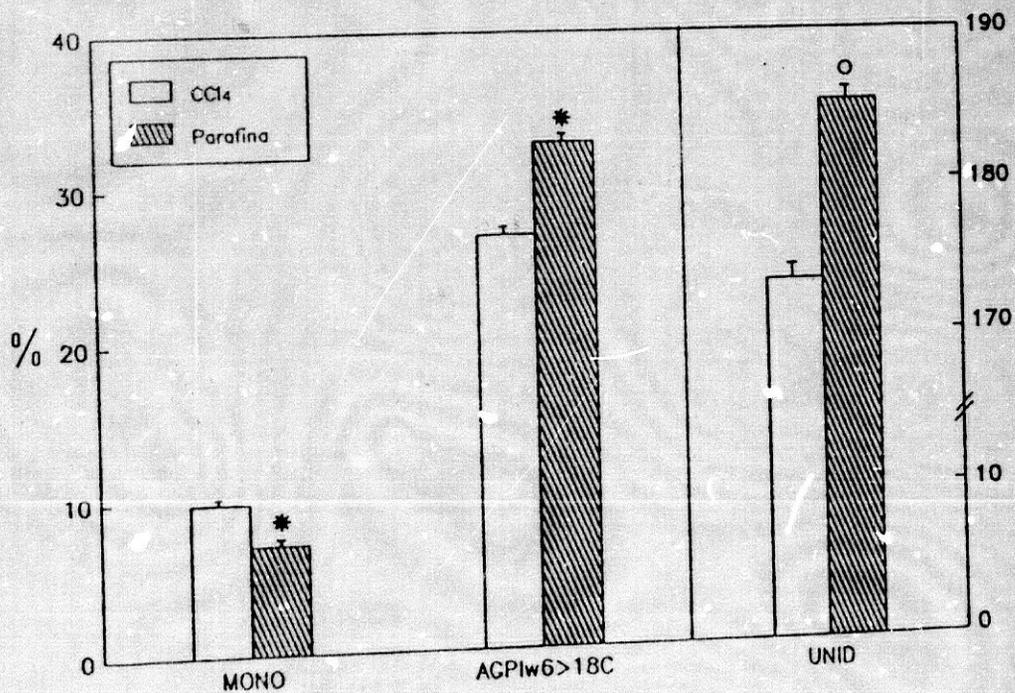
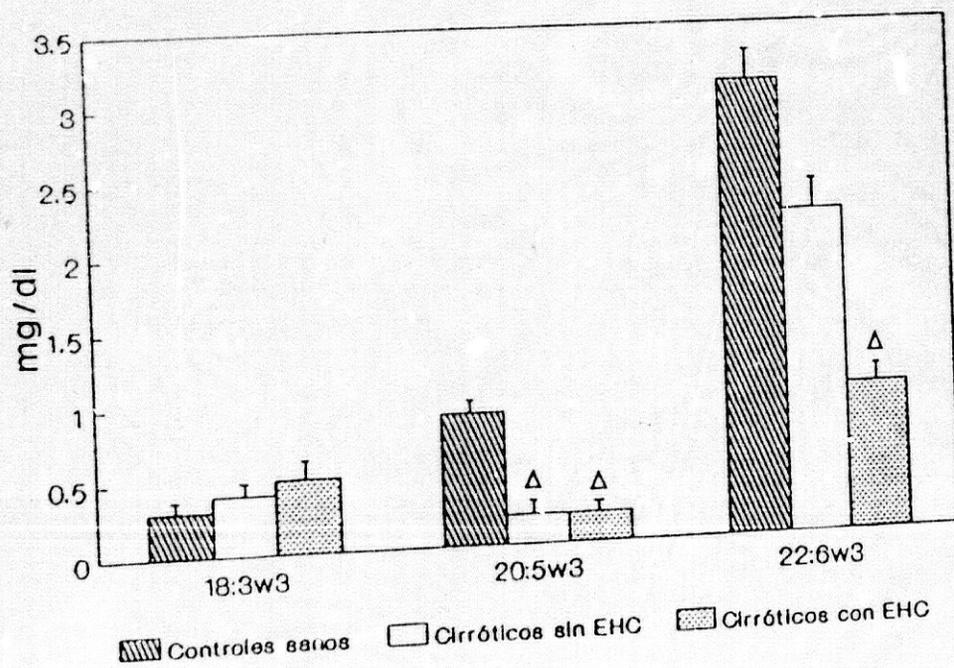
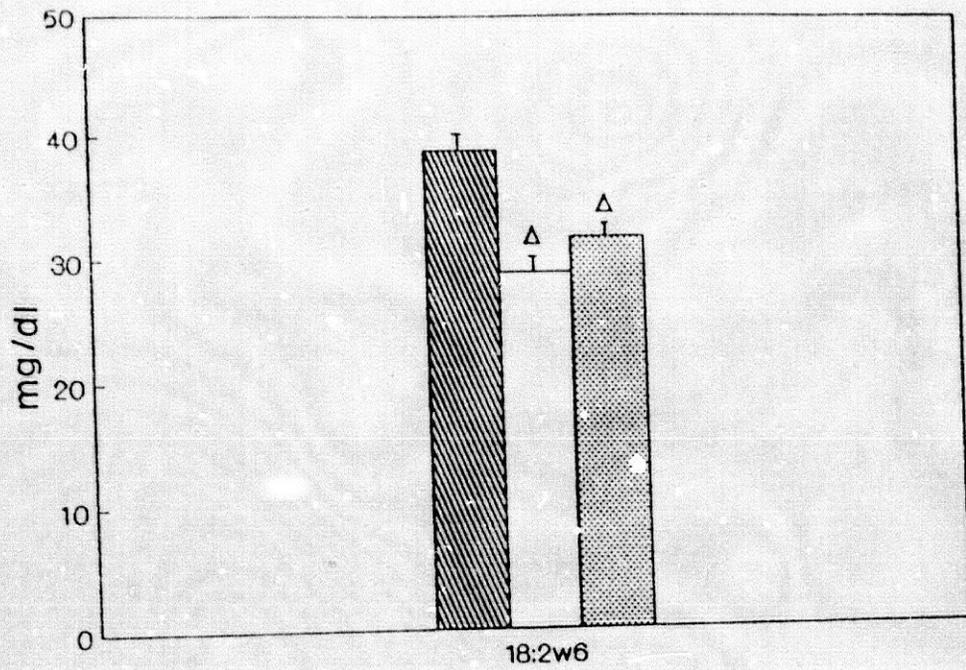


FIGURA 11. Concentración de los componentes mayoritarios de las series w6 y w3 de los ácidos grasos poliinsaturados plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin encefalopatía hepática crónica (EHC) y en controles sanos.

$\Delta p < 0.05$ vs Controles sanos

FIGURA 11



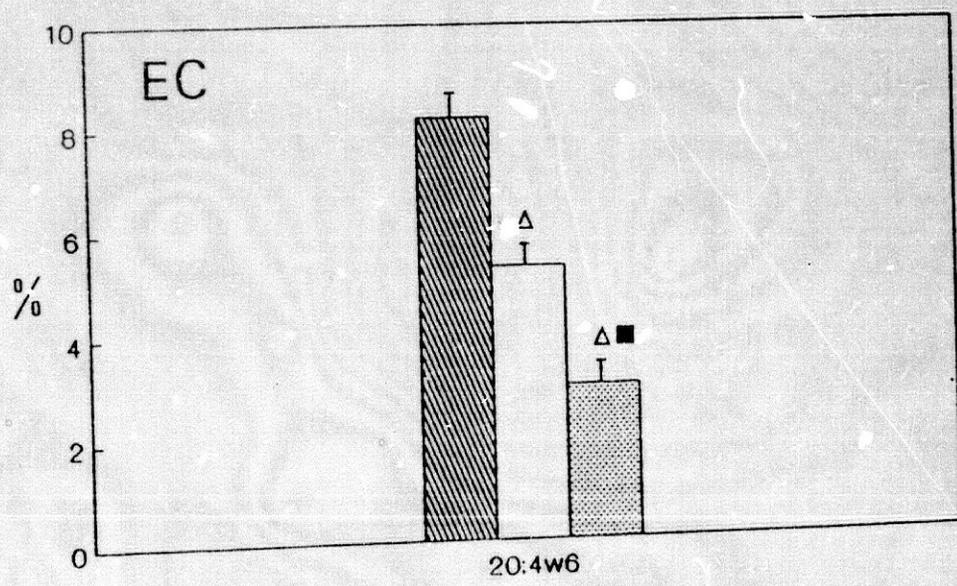
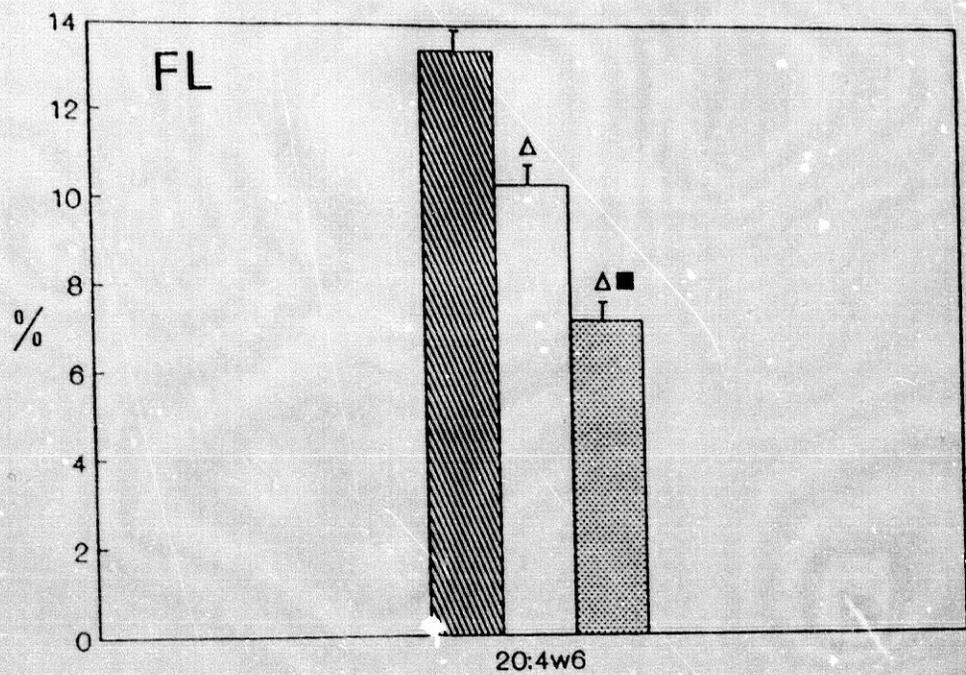
Controles bajos
 Cirróticos sin EHC
 Cirróticos con EHC

FIGURA 12. Composición porcentual en ácido araquidónico (20:4w6) de los fosfolípidos (FL) y ésteres de colesterol (EC) plasmáticos en pacientes cirróticos con y sin encefalopatía hepática crónica (EHC) y en controles sanos.

$\Delta_p < 0.05$ vs Controles sanos

■ $p < 0.05$ vs Cirróticos sin EHC

FIGURA 12



▨ Controles sanos □ Cirróticos sin EHC ▤ Cirróticos con EHC

5.- DISCUSSION

5.- DISCUSION

5.1.- PACIENTES CIRROTICOS

El objeto del presente estudio era dilucidar el papel de la malnutrición en la producción de las alteraciones en el perfil de ácidos grasos plasmáticos características de la cirrosis. De hecho, también hemos encontrado que la disminución del colesterol plasmático está asociada al grado de malnutrición. Como los niveles de colesterol libre permanecen constantes, es lógico pensar que la disminución del colesterol total se deba a la fracción esterificada. Wilcox y col. habían señalado hace tiempo la existencia de bajos niveles de colesterol esterificado en pacientes cirróticos, sobre todo en los más gravemente afectados, aunque no se realizó ningún

tipo de clasificación según el estado nutricional (Wilcox y col., 1978). La disminución de los niveles plasmáticos de colesterol esterificado en algunas enfermedades hepáticas se atribuye a una baja actividad o a una menor síntesis de la LCAT (Owen y col., 1978; Simon y Scheig, 1970; Sabesin y col., 1977). Parece claro que la malnutrición puede afectar la síntesis de esta enzima, ya que se trata de una situación en la que disminuyen en general la síntesis de proteínas plasmáticas de origen hepático (Mezey, 1978; Patek, 1979).

Contrariamente al colesterol, la disminución de los fosfolípidos plasmáticos no guarda relación con el grado de malnutrición, aunque Wilcox y col. lo relacionan con la gravedad de la enfermedad (Wilcox y col., 1978).

El principal hallazgo de este estudio ha sido que la disminución de algunos AGPI de larga cadena, especialmente 20:3w6 y 20:4w6, en los lípidos plasmáticos totales así como en las fracciones de colesterol esterificado y fosfolípidos, está relacionada con el grado de malnutrición. El 18:2w6, precursor de los AGPI citados, también disminuye conforme avanza la malnutrición, especialmente en plasma y en la fracción de ésteres de colesterol. Estos bajos niveles de 18:2w6 pueden deberse a una disminución en la ingesta o a una alteración en la absorción por defecto de ácidos biliares o por la existencia de linfagiectasia, que es frecuente en la cirrosis (Carey, 1982). En el caso de los AGPI de larga cadena, las causas de su descenso en plasma pueden ser las mismas que para el 18:2w6 pero debemos considerar además la posibilidad de una disminución en la actividad de las desaturasas hepáticas. De hecho, estas enzimas parecen ser poco activas en ratas alimentadas con dietas pobres en proteínas (De Tomas y col., 1980), y se ha sugerido que están disminuidas en niños malnutridos (Holman y col., 1981).

En nuestro estudio también podemos contemplar esta hipótesis puesto que la relación 18:2w6/20:4w6 en ácidos grasos totales y en la fracción de fosfolípidos aumenta en los pacientes cirróticos. Entre las enzimas implicadas en la conversión de 18:2w6 en 20:4w6 quizá se pudiera pensar en la Δ^6 desaturasa como la más probablemente afectada al tomar en consideración los trabajos realizados por Bereziat y col. (1985). Estos autores encuentran que la suplementación con aceite de primula (*Oenothera biennis*), que es muy rico en ácido γ -linolénico (18:3w6), conduce a un aumento de 20:3w6 y 20:4w6 en fosfolípidos y ésteres de colesterol de estos pacientes, sugiriendo que las actividades de la 18-20 elongasa y la Δ^5 desaturasa están preservadas en estas condiciones.

Con independencia del mecanismo subyacente, vale la pena resaltar la importancia de que la malnutrición contribuya claramente a la producción de alteraciones del perfil de los ácidos grasos plasmáticos, puesto que señala una vía terapéutica interesante para estos pacientes. La adición de ácido araquidónico a la dieta de los pacientes cirróticos había sido ya sugerida por Johnson y col. (1985). Sin embargo, estos autores han atribuido las alteraciones de los ácidos grasos plasmáticos al daño hepático y no al estado nutricional porque no encontraron descensos significativos en el porcentaje de 18:2w6 en la fracción de fosfolípidos plasmáticos (Holman y Johnson, 1981). Debemos decir a este respecto que este grupo de investigadores, cuya contribución al conocimiento del metabolismo de los AGPI en una larga serie de estados patológicos ha sido por otra parte decisiva, centraron su interés exclusivamente en la fracción de fosfolípidos y no realizaron determinaciones en plasma total o en los ésteres de colesterol. Además, las medidas fueron solo de tipo porcentual y no cuantitativas, y tampoco clasificaron a los pacientes en grupos caracterizados por su estado nutricional. Es importante destacar que nuestro estudio es el primero que

se realiza según este criterio de clasificación. Teniendo en cuenta además el importante número de pacientes analizados y el hecho de haber realizado las determinaciones en varias fracciones plasmáticas y con resultados cuantitativos -por medio de los controles internos- y no solo porcentuales, no nos parece aventurado atribuir en gran parte las alteraciones en los AGPI plasmáticos a la malnutrición. En nuestro estudio hubo siempre una disminución del 18:2w6 en los ácidos grasos totales y en los ésteres de colesterol de acuerdo con el estado nutricional y por lo que se refiere a la fracción de fosfolípidos, también existió una disminución significativa, aunque solo en el grupo de pacientes con malnutrición severa, lo que puede explicar perfectamente la disparidad de nuestros resultados y conclusiones con las del grupo de Holman. Lo que parece claro en cualquier caso es que la fracción de ésteres de colesterol es la más sensible a los cambios de AGPI en concordancia con lo señalado previamente por Caren y Corbo (1966).

5.2.- MODELO EXPERIMENTAL

El tratamiento con CCl_4 se ha mostrado eficaz para producir una degeneración hepática experimental, tal como ha sido documentado ampliamente (Cameron y Karunaratne, 1936; Paquet y Kamphasuen, 1975; Valcázar Alon. y col, 1980; Matsubara y col, 1983; El-Dessoukey y col, 1977; Villarruel y col, 1987; Clawson, 1989; Villela, 1964; Poli y col, 1985; Recknagel, 1983). En nuestras condiciones de trabajo pretendíamos que estas alteraciones hepáticas se produjeran gradualmente a fin de que el modelo no difiriera demasiado de la cirrosis humana, incluyendo la aparición de malnutrición.

Del estudio histológico realizado se deduce que la degeneración

ración hepática tras tratamiento con CCl_4 se inicia alrededor de la vena terminal o centrolobulillar, produciendo una necrosis masiva. La degeneración se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos hasta que ocupan todo el citoplasma. En las células con este aspecto se observan signos de muerte celular. En algunos casos, alrededor de la vena se observan abundantes fibroblastos y núcleos de forma irregular que pueden pertenecer a leucocitos o linfocitos infiltrados para eliminar restos. Por otra parte, el tratamiento con parafina no parece afectar la constitución normal del hígado.

Analíticamente se puede apreciar un aumento importante de las transaminasas en sangre, como es habitual en el estado cirrótico. El aumento es mayor en la GPT, enzima citoplasmática, que en la GOT, citoplasmática y mitocondrial. Ello indica que la necrosis celular no es todavía demasiado importante a nivel global, en concordancia con los datos histológicos.

Por otra parte, los incrementos de peso en ambos lotes de animales sugieren que a lo largo del tratamiento se instaura un estado de malnutrición en el grupo de ratas tratadas con el tóxico.

Se han encontrado en los animales tratados unas alteraciones plasmáticas que concuerdan en líneas generales con las halladas en pacientes cirróticos. Estos animales exhiben una disminución de colesterol total y colesterol esterificado, como en los humanos, aunque también disminuye la fracción de colesterol libre y los fosfolípidos. Los resultados obtenidos en la determinación de los ácidos grasos plasmáticos así como la composición porcentual de estos compuestos en las fracciones de fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos de los animales tratados con CCl_4 están estrechamente

relacionados con los obtenidos en los pacientes cirróticos. En general, existe una disminución de los ácidos 18:2w6 y 20:4w6 y una elevación de los ácidos monoinsaturados 16:1w7 y 18:1w9 en todas las fracciones plasmáticas.

La utilización del modelo experimental de degeneración hepática nos ha permitido iniciar una profundización en la investigación de los mecanismos que intervienen en la producción de las alteraciones plasmáticas. Estas existen también en los microsomas hepáticos aunque son menos intensas. En efecto, el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de microsomas hepáticos se diferencia del que se encuentra en plasma por la constancia del 18:2w6 y el aumento de ácido δ -dihomo-linolénico (20:3w6). Además, la disminución característica del 20:4w6 es menos importante. Por otra parte, al contrario que en el plasma, el tratamiento con CCl_4 produce un aumento de colesterol y de los fosfolípidos en los microsomas hepáticos al expresarlos por mg de proteína, lo que no es sorprendente dadas las pérdidas proteicas del hígado en estas condiciones.

Por lo que se refiere al estudio enzimático, el aumento en la actividad de la Δ^5 y Δ^6 desaturasa por el tratamiento con el agente tóxico parece descartar su implicación en la disminución de los AGPI de larga cadena en el plasma, característica del estado cirrótico, subrayando por tanto el importante papel de la malnutrición.

Por supuesto, se podría invocar una hipotética disminución de la actividad Δ^5 desaturasa, tal como sugiere el aumento relativo de 20:3w6 (su sustrato) en relación al 20:4w6 (su producto). En cualquier caso, el aumento en la actividad de las desaturasas Δ^5 y Δ^6 encontrado en nuestras condiciones experimentales podrían explicarse por el peculiar mecanismo de la acción tóxica del CCl_4 . Este compuesto produce peroxi-

sación lipídica, lo que debe traducirse por una disminución del índice de insaturación. El aumento en las actividades desaturantes supondría un mecanismo de regulación para contrarrestar este efecto del agente tóxico y mantener la adecuada fluidez de las membranas, dado que no hay alteraciones en la relación molar colesterol/fosfolípidos, lo que descarta la contribución de las variaciones en los niveles de colesterol en el mantenimiento de dicha fluidez.

El efecto hepatotóxico del CCl_4 se traduce también en una disminución de la síntesis proteica. La depresión de la proteino-síntesis junto a la pérdida proteica concomitante a las grandes áreas de necrosis producidas por el agente tóxico puede significar de hecho la disminución de la concentración de las enzimas desaturantes, pero esto es compatible con el aumento de la actividad "in vitro" inducido por los cambios en la fluidez de las membranas microsómicas. Globalmente, la disminución de la cantidad de enzima podría ser el fenómeno predominante "in vivo" y podría constituir una explicación para la hipoproducción de AGPI de larga cadena en el retículo endoplásmico del hepatocito. El déficit proteico supondría también una explicación para la disminución plasmática de estos AGPI, al afectar negativamente la secreción y transporte de lipoproteínas por el hígado.

La inhibición de la síntesis de proteínas y de la secreción lipoproteica podría explicar también el aumento de colesterol y fosfolípidos en los microsomas de los animales tratados con CCl_4 así como su disminución en plasma. Como en el caso de los pacientes cirróticos, el mayor descenso corresponde a los ésteres de colesterol, como probable consecuencia de la síntesis disminuida de LCAT.

5.3.- PACIENTES CON ENCEFALOPATIA HEPATICA CRONICA

El desarrollo de encefalopatía hepática crónica (EHC) en un paciente cirrótico se traduce con frecuencia en un número creciente de "shunts" porta-sistémicos espontáneos. En estas condiciones era esperable una acentuación de la deficiencia en AGPI por la disminución del aporte de AGE al hígado en las fases postabsortivas. Los resultados obtenidos en pacientes cirróticos con EHC no han diferido de los pacientes sin EHC con el mismo estado nutricional en los niveles de AGPI de las series endógenas w7 y w9 en ninguna de las fracciones ensayadas, así como tampoco en los niveles de 18:2w6. Sin embargo, los pacientes con EHC tenían menores concentraciones de 20:4w6, especialmente en las fracciones de fosfolípidos y ésteres de colesterol, confirmando la hipótesis de trabajo. Es destacable que estos datos difieren de los encontrados previamente en pacientes con encefalopatía hepática aguda (Wilcox y col., 1978), lo que señala diferencias interesantes en cuanto a la posible intervención dietética en ambos tipos de encefalopatía hepática.

Las alteraciones de los niveles de otros AGPI de la serie w6 (20:3w6) y de la serie w3 (20:5w3) observados en algunas de las fracciones estudiadas fueron idénticas en ambos grupos de cirróticos. Sin embargo, se ha observado una disminución generalizada en los niveles de 22:6w3 en los pacientes con EHC, especialmente significativa en los lípidos totales plasmáticos y en la fracción de fosfolípidos. Es importante destacar que el ácido docosaheptaenoico es el más abundante en los fosfolípidos de las membranas neuronales y en la retina (Bazan y col., 1986; Neuringer y Connor, 1986; Martínez y col., 1988). Aunque este hallazgo no supone una relación de causa a efecto, permite especular que la deficiencia en 22:6w3 podría contribuir a la disfunción neuronal de la EHC. Esta hipótesis

merece una investigación ulterior puesto que puede arrojar nueva luz en la patogenesis y tratamiento dietético de esta condición clínica.

5.4.- CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados descritos en esta memoria doctoral apoyan fuertemente nuestra hipótesis de trabajo. En efecto, existe un paralelismo claro entre el descenso plasmático de los AGPI y el grado de malnutrición de los pacientes cirróticos, especialmente cuando los resultados se expresan en términos cuantitativos para los ácidos grasos totales en plasma. Resulta difícil dilucidar la contribución del propio daño hepático a esta deficiencia.

La utilización del modelo experimental no ha puesto de manifiesto alteraciones en las desaturasas hepáticas. Sin embargo, esto no permite obtener conclusiones de este tipo para los pacientes cirróticos humanos, dadas las sensibles diferencias específicas y las peculiaridades del tratamiento hepatotóxico empleado.

Lo que nos parece importante es la relación existente entre el déficit plasmático de AGPI y el estado nutricional. Está demostrado que los niveles plasmáticos de ácidos grasos se corresponden con los de las membranas a equibales a la investigación y es lógico pensar que el descenso del ácido araquidónico en plasma se traduzca también en deficiencias tisulares. Esto parece especialmente crítico en los cirróticos con ascitis en los que el descenso de la síntesis de prostaglandinas consiguiente a la disminución de araquidónico podría afectar negativamente a la función renal, desarrollándose el síndrome hepatorenal (Epstein, 1986; Zipser y col.

1979; Arroyo y col, 1983; Pérez-Ayuso y col, 1984; Zipser y col, 1983). O en los pacientes con EHC, que podrían ser afectados por la carencia de ácido docosaheptaenoico (22:6w3) en las estructuras cerebrales.

Por tanto, estos enfermos podrían beneficiarse de la adición de los correspondientes AGPI a sus dietas, no solo de los AGE. linoleico y linolénico, sino de los derivados poliinsaturados de larga cadena, araquidónico y docosaheptaenoico.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- 1.- El estado nutricional influye decisivamente en las alteraciones de los lípidos plasmáticos que se observan en los pacientes cirróticos.
- 2.- El mecanismo de la contribución del propio daño hepático a estas alteraciones no ha podido ser dilucidado con nuestro modelo experimental.
- 3.- Los pacientes cirróticos con encefalopatía hepática crónica manifiestan un déficit plasmático acentuado en ácido araquidónico y, especialmente, en ácido docosahexaénico.

4.- Parece aconsejable la suplementación dietética adecuada en ácidos grasos poliinsaturados para los pacientes cirróticos, incluyendo ácido docosahexaenoico en los afectados por encefalopatía crónica.

7.- BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

ABAD A, CABRE E, GONZALEZ-HUIX F, et al. 1987. Influence of the nutritional status in the prognosis and clinical outcome of hospitalized patients with liver cirrhosis. Preliminary report. J Clin Nutr Gastroenterol, 2: 63-68.

ADES IZ. 1982. Transport of newly synthesized proteins into mitochondria, a review. Mol Cell Biochem, 43: 113-127.

ALBANO E, LOTT KAK, SLATER TF, STIER A, SYMONS MCR, TOMASI A. 1982. Spin-trapping studies on the free-radical products formed by metabolic activation of carbon tetrachloride in rat liver microsomal fractions, isolated hepatocytes and in vivo in the rat. Biochem J, 204: 593-603.

ARROYO V, PLANAS R, GAYA J, et al. 1983. Sympathetic nervous activity, renin-angiotensin system and renal excretion of prostaglandins E₂ in cirrhosis. Relationship to functional renal failure and sodium and water excretion. *Eur J Clin Invest*, 13: 271-8.

BARTLETT GR. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234: 466-470.

BAZAN NG, REDDY TS, BAZAN HEP, BIRKLE DL. 1986. Metabolism of arachidonic and docosahexaenoic acids in the retina. *Prog Lip Res*, 25: 595-606.

BENEDETTI A, CASINI AF, FERRALI M, COMPORTI M. 1977. Studies on the relationships between carbon tetrachloride-induced alterations of liver microsomal lipids and impairment of glucose-6-phosphatase activity. *Exp. Mol Pathol*, 27: 309-323.

BEREZIAT G, CALMUZ Y, MENDY F, CHAMBAZ J, DELAYE N, POUPON R. 1985. Effets d'un régime enrichi en acides gras à chaîne courte et en acides gras essentiels sur les anomalies lipidiques constatées lors de la cirrhose. *Cah Nutr Diet*, 20: 131-134.

BITMAN J, WOOD DL, HAMOSH M, HAMOSH P, MEHTA NR. 1983. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am J Clin Nutr*, 38: 300-312.

BJERVE KS, MOSTAD IL, THORESEN L. 1937. Alpha-linolenic acid deficiency in patients on long-term gastric-tube feeding: estimation of linolenic acid and requirement in man. *Am J Clin Nutr*, 45: 66-77.

BRATTIN W, WALLER R. 1984. Effect of halomethanes on intracellular calcium distribution in hepatocytes. *Life Sci*, 35: 1231-1240.

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

BRENNER RR, PELUFFO RO. 1969. Regulation of unsaturated fatty acids biosynthesis 1. Effect of unsaturated fatty acid of 18 carbons on the microsomal desaturation of linoleic into γ -linolenic acid. *Biochim Biophys Acta*, 176: 471-479.

BRENNER RR, PELUFFO RO, NERVI AM, DETOMAS ME. 1969. Competitive effect of α and γ -linolenyl-CoA and arachidonyl-CoA in linoleyl-CoA desaturation to δ -linolenyl-CoA. *Biochim Biophys Acta*, 176: 420-422.

BRENNER RR. 1982. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Progr Lipid Res*, 20: 41-48.

BUCOLO G, DAVID H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*, 19: 476-482.

BUDOWSKI P, CRAWFORD MA. 1985. α -linolenic acid as a regulator of the metabolism of arachidonic acid: dietary implications of the ratio, n-6:n-3 fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 44: 221-229.

- BURR GO, BURR MM. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*, 82: 345-367.
- BUTTERWORTH C, BLACKBURN G. 1976. Hospital malnutrition and how to assess the nutritional status of a patient. *Nutr Today*, 10: 8-18.
- CAMERON GR, KARUNARATNE WAE. 1970. *J Path Bact*, 42: 1.
- CAREN R, CORBO L. 1966. Plasma fatty acids in pancreatic cystic fibrosis and liver disease. *J Clin Endocr*, 26: 470-477.
- CAREY MC. 1982. The enterohepatic circulation. In *The Liver. Biology and Pathobiology*. I.M. Arias, H. Popper, D Schachter, and DA Sharifitz, editors. Raven Press, New York, 454-455.
- CASTRO J, SASAME H, SUSSMAN H, BULLETTE P. 1968. Diverse effects of SKF525A and antioxidants on CCl₄-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism. *Life Sci*, 7: 129-136.
- CASTRO JA, DIAZ COMEZ MI. 1972. Studies on the irreversible binding of ¹⁴CCl₄ to microsomal lipids in rats under varying experimental condition. *Toxicol Appl Pharmacol*, 23: 541-552.
- CASTRO JA, DIAZ GOMEZ MI, FERREYRA (de) EC, CASTRO (de) CR, D'ACOSTA N, FENOS (de) M. 1973. Differences in the carbon tetrachloride-induced damage to components of the smooth and rough endoplasmic reticulum from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 50: 337-343.

CASTRO CR, BERNACCHI (de) AS, VILLARRUEL MC, FERNANDEZ G, CASTRO JA. 1984. Carbon tetrachloride activation by highly purified liver mitochondrial preparations. *Agents and Actions*, 15: 664-667.

CLANDININ MT, WONG K, HACKER RR. 1985a. Synthesis of chain-elongated desaturated fatty acids from palmitic acid by liver and brain microsomes during development of the pig. *Comp Biochem Physiol*, 81B: 53-54.

CLANDININ MT, WONG K, HACKER RR. 1985b. Synthesis of chain elongation-desaturation products of linoleic acid by liver and brain microsomes during development of the pig. *Biochem J*, 226: 305-309.

CLANDININ MT, WONG K, HACKER RR. 1985c. Delta 5-Desaturase activity in liver and brain microsomes during development of the pig. *Biochem J*, 227: 1021-1023.

CLAWSON G, MacDONALD J, WOO C. 1987. Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl₄. *J Cell Biol*, 105: 705-711.

CLAWSON GA. 1989. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity. *Pathol Immunopathol Res*, 8: 107-112.

CORONGIU FP, LAI M, MILIA A. 1983. Carbon tetrachloride, bromotri-chloromethane and ethanol acute intoxication. *Biochem J*, 212: 625-631.

CRAWFORD MA, HASSAM AG, STEVENS PA. 1981. Essential fatty acid requirements in pregnancy and lactation with special reference to brain development. *Prog Lipid Res*, 20: 31-40.

- DeGROOT H, HAAS W. 1981. Self-catalyzed, molecular oxygen-independent inactivation of NADPH - or dithionite-reduced microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol*, 30: 2343-2347.
- DeLUCCHI C, PITA ML, FAUS MJ, MOLINA JA, UAUY R, GIL A. 1987. Effects of dietary nucleotides on the fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 6: 568-574.
- DeLUCCHI C, PITA ML, FAUS MJ, PERIAGO JL, GIL A. 1988. Influences of diet and postnatal age on the lipid composition of red blood cell membrane in newborn infants. *Ann Nutr Metab*, 32: 231-239.
- DeSCHRIJVER R, PRIVETT OS. 1982. Effects of dietary long-chain fatty acids on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in the rat. *J Nutr*, 112: 619-626.
- DeTOMAS ME, MERCURY J, RODRIGO MA. 1980. Effect of dietary protein and EFA deficiency on liver 5, 6 and 9 desaturase activities in the early-developing rats. *J Nutr*, 110: 595-599.
- DIAZ GOMEZ MI, CASTRO JA, FERREYRA (de) EC, D'ACOSTA N, CASTRO (de) CR. 1973. Irreversible binding of $^{14}\text{CCl}_4$ to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed-function oxygenase activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 25: 534-541.
- DIAZ GOMEZ MI, CASTRO JA. 1980. Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 27: 191-194.

- EDDY DE. 1973. Dietary fat influences on brain and liver fatty acid composition: importance of docosahexaenoic acid (22:6n-3). University of Nebraska, Ph.D. thesis.
- EL-DESSOUKEY EA, AWADALLAH R, EL-ATTAR S. 1977. Biochemical changes under the effect of carbon tetrachloride intoxication. *J Nutr Sci*, 16: 217-222.
- ELIAS PM, BROWN BE, ZIBOH VA. 1980. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: Evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol*, 74: 230-233.
- EPSTEIN M. 1986. Renal prostaglandins and the control of renal function in liver disease. *Am J Med*, 80: Suppl. 1A, 46-55.
- ESDERS IW, MICHIRINA CA. 1979. Purification and properties of L- α -glycerophosphate oxidase from Streptococcus faecium ATCC 12755. *J Biol Chem*, 254: 2710-2715.
- FISKE GH, SUBBAROW YL. 1925. *J Biol Chem*, 65: 375.
- FLEMING CR, SMITH LM, HODGES RE. 1976. Essential fatty acid deficiency in adults receiving total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr*, 29: 976-983.
- FOLCH J, LESS M, STANLEY S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226: 479-503.
- FORNI LG, PACKER JE, SLATER TF, WILLSON RL. 1983. Reaction of the trichloromethyl and halothane - derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study. *Chem Biol Interact*, 45: 171-177.

- GALLI C, TRZECIAR HI, PAOLETTI R. 1971. Effect of dietary fatty acids on the fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride: reciprocal replacement of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 54: 248-449.
- GALLI C, SOCINI A. 1983. Dietary lipids in pre- and post-natal development. In: Perkins EG, Visek WJ, eds. *Dietary Fats and Health*. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 279-301.
- GASSULL MA, CABRE E, VILAR L, ALASTRUE A, MONTSERRAT A. 1984. Protein-energy malnutrition: An integral approach and a simple new classification. *Hum Nutr Clin Nutr*, 38C: 419-431.
- GIL A, PITA ML, MARTINEZ JA, SANCHEZ-MEDINA F. 1986. Effect of dietary nucleotides on the plasma fatty acids in at-term neonates. *Hum Nutr: Clin Nutr*, 40C: 185-195.
- GIL A, LOZANO E, DeLUCCHI C, MALDONADO J, MOLINA JA, PITA ML. 1988. Changes in the fatty acids profiles of plasma lipid fractions induced by dietary nucleotides in infants born at term. *Eur J Clin Nutr*, 42: 473-481.
- GLEND E FA, HRUSZEWY EZ AM, RECKNAGEL RO. 1976. Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose 6-phosphatase. *Biochem Pharmacol*, 25: 2163-2170.
- GUNNLAUGSSON O, BERKOWITZ D. 1977. Individual free fatty acids in patients with liver disease. *Am J Dig Dis*, 22: 1005-1009.

- HANSEN AE. 1957. Role of unsaturated dietary fat in infant nutrition. *Am J Public Health*, 47: 1367-1370.
- HANSEN AE, HAGGARD ME, BOELSCHE AN, et al. 1958. Essential fatty acids in human nutrition. *J Nutr*, 60: 565-576.
- HARRIS RN, HARRIS RATNAYAKE J, GARRY VF, ANDERS MW. 1982. Interactive hepatotoxicity of chloroform and carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 63: 281-291.
- HOLMAN RT. 1960. The ratio of trienoic: tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement. *J Nutr*, 70: 405-410.
- HOLMAN RT. 1966. Essential fatty acid deficiency. Progress in the chemistry of fats and other lipids. RT Holman, editor. Pergamon Press, New York, 275-348.
- HOLMAN RT, SMYTHE L, JOHNSON J. 1979. Effect of sex and age on fatty acid composition in human serum lipids. *Am J Clin Nutr*, 32: 2390-2399.
- HOLMAN RT. 1981. Polyunsaturated fatty acid profiles in human disease. In *New Trends in Nutrition, Lipid Research, and Cardiovascular Diseases*. AR Liss, editor. INC, New York, 25-42.
- HOLMAN RT, JOHNSON S. 1981. Changes in essential fatty acid profile of serum phospholipids in human disease. *Prog Lip Res*, 20: 67-73.
- HOLMAN RT, JOHNSON SB, MERCURY O, ITARTE HJ, RODRIGO MA, DeTOMAS ME. 1981. Essential fatty acid deficiency in malnourished children. *Am J Clin Nutr*, 34: 1534-1539.

- HOLMAN RT, JOHNSON SB, HATCH TF. 1982. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*, 35: 617-623.
- HOLMAN RT. 1986. Nutritional and functional requirements for essential fatty acids. In dietary fat and cancer. AR Liss, editor. INC, New York, 211-228.
- HOLLOWAY PV. 1975. Desaturation of long-chain fatty acids by animal liver. In *Methods in Enzymology*. JM Lowenstein, editor. Academic Press, New York, 35: 253-262.
- HORROBIN DF, CUNNANE SC. 1981. Is the triene/tetraene ratio always a valid indicator of functional essential fatty acid deficiency? *Frog Lip Res*, 20: 831-833.
- HORROBIN DF. 1982. Essential fatty acids: A review. In *Clinical uses of essential fatty acids*. DF Horrobin, editor. Eden Press INC, Canada, 3-36.
- JEFFCOAT R. 1979. The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver. In *Essays in Biochemistry*. Campbell PN, Marshall RD, editors. Ac. Press, 15: 1-36.
- JOHNSON SB, GORDON E, McCLAIN C, LOW G, HOLMAN RT. 1985. Abnormal polyunsaturated fatty acid patterns of serum lipids in alcoholism and cirrhosis: Arachidonic acid deficiency in cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 1815-1818.
- JONES I. 1983. Chloroform anaesthesia in Liverpool. *Anaesthesia*, 38: 578-580.

- KING KC, ADAM PAJ, LASKOWSKI DE, SCHWARZ R. 1971. Sources of fatty acids in the newborn. *Pediatrics*, 47: 192-198.
- KOLETZKO B, SCHMIDT E, BREMER HJ, HAUG M, HARZER G. 1987. Dietary long chain polyunsaturates for premature infants. *J Ped Gastroenterol and Nutr*, 6: 997-999.
- LEVY GN, BRABEC MJ. 1984. Binding of carbon tetrachloride metabolites to rat hepatic mitochondrial DNA. *Toxicol Lett*, 22: 229-234.
- LEWIS RA, AUSTEN KF. 1984. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest*, 73: 889-897.
- LIU CCF, CARLSON SE, RHODES PG, RAO VS, MEYDRECH EF. 1987. Increase in plasma phospholipid docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids as a reflection of their intake and mode of administration. *Ped Res*, 22, 3: 292-296.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- MAHFOUZ M, HOLMAN RT. 1980. Desaturation of isomeric cis 18:1 acids. *Lipids*, 15: 63-65.
- MAHFOUZ MM, JOHNSON S, HOLMAN RT. 1980. The effect of isomeric trans-18:1 acids on the desaturation of palmitic, linoleic and eicosa- ω -11,14-trienoic acids by rat liver microsomes. *Lipids*, 15: 100-107.
- MAHFOUZ M. 1981. Effect of dietary trans fatty acid on the delta-5, delta-6 and delta-8 desaturases of rat liver microsomes in vivo. *Acta Biol Med Ger*, 40: 1699-1705.

- MAHFOUZ MM, SMITH TL, KUMMEROW FA. 1984. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat liver microsomes. *Lipids*, 19: 214-222.
- MALDONADO J, GIL A, FAUS MJ, PITA ML, MOLINA JA. 1987. Serum fatty acids and amino acids. Are they markers of the severity and outcome in trauma children? *J Clin Nutr Gastroenterol*, 2: 74-80.
- MARTINEZ M, BALLABRIGA A, GIL-GIBERNAU J. 1988. Lipids of the developing human retina. Total fatty acids, plasmalogens and fatty acid composition of ethanolamine and choline phosphoglycerides. *J Neurosci Res*, 20: 484-490.
- MATSUBARA T, MORI S, TOUCHI A, MASUDA Y, TAKEUCHI Y. 1983. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *Japan J Pharmacol*, 33: 435-445.
- MCCARTHY DM, MAY RJ, MAHER M et al. 1978. Trace metal and essential fatty acid deficiency during total parenteral nutrition. *Am J Dig Dis*, 23: 1009-1016.
- MEAD JF, FULCO AJ. 1976. The unsaturated and polyunsaturated fatty acids in health and disease. CC Thomas, Springfield.
- MEZEY E. 1978. Liver disease and nutrition. *Gastroenterology*, 74: 770-783.
- MORRISON WR, SMITH LM. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride methanol. *J Lipid Res*, 5: 600-608.
- MUSUDA Y. 1981. *Japan J. Pharmacol*, 31: 107-116.

- NEEDLEMAN P, TURK J, JAKSCHIK BA, MORRISON AR, LEGKOWITH JB. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem*, 55: 69-102.
- NEELANDS PJ, CLANDININ MT. 1983. Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagen-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochem J*, 212: 573-583.
- NEURINGER M, CONNOR WE. 1986. n-3 Fatty acids in the brain and retina: Evidence for their essentiality. *Nutr Rev*, 44: 285-294.
- NOGUCHI T, FONG KL, LAI EK, OLSON L, McCAY PB. 1982a. Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of carbon tetrachloride-treated rat. Relationship to Cytochrome P 450 content. *Biochem Pharm*, 31: 609-614.
- NOGUCHI T, FONG KL, LAI EK, ALEXANDER SS, KING MM, OLSON L, FOYER JL, McCAY PB. 1982b. Specificity of a phenobarbital - induced cytochrome P 450 for metabolism of carbon tetrachloride to the trichloromethyl radical. *Biochem Pharmacol*, 31: 615-624.
- OWEN JS, HUTTON RA, HOPE MJ, HARRY DS, BRUCKDORFER KR, DAY RC, McINTYRE N, LUCY JA. 1978. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cell membrane lipids and function in human liver disease. *Scand J Clin Lab Invest*, 38: Suppl. 150, 228-232.
- OWEN JS, HUTTON RA, DAY RC, BRUCKDORER KR, McINTYRE N. 1981. Platelet lipid composition and platelet aggregation in human liver disease. *J Lipid Res*, 22: 423-430.

- OWEN JS, BRUCKDORFER KR, DAY RC, McINTYRE N. 1982. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J Lipid Res*, 23: 124-132.
- OWEN JS, McINTYRE N, GILLET MPT. 1984. Lipoproteins, cell membranes and cellular functions. *Trends Biochem Sci*, 9: 238-242.
- PACKER JE, SLATER TF, WILLSON RL. 1978. Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl_3O_2) with amino acids: pulse radiolysis evidence. *Life Sci*, 23: 2617-2620.
- PAQUET KJ, KAMPHAUSEN U. 1975. The carbon tetrachloride hepatotoxicity as a model of liver damage. *Acta Hepato-Gastroenterol*, 22: 84-88.
- FATEK AJ. 1979. Alcohol, malnutrition, and alcoholic cirrhosis. *Am J Clin Nutr*, 32: 1304-1312.
- PATURNEAU-JOUAS M, DURAND G, NOUVELOT A, MASSON M, BOURRE JM. 1982. Influence of dietary essential fatty acid composition in peripheral nerve and muscle. *Reprod Nutr Dévelop*. 22 (1B): 193-200.
- PAUL AA, SOUTHGATE DAT. 1978. The composition of foods. London, HMSO.
- PAULSRUD JR, PENSLER L, WHITTEN OF et al. 1972. Essential fatty acid deficiency in infants induced by fat-free intravenous feeding. *Am J Clin Nutr*, 25: 897-904.

- PELUFFO RR, AYALA S, BRENNER RR. 1970. Metabolism of fatty acids of the linoleic acid series in the testicles of diabetic rats. *Am J Physiol*, 218: 669-673.
- PEREZ-AYUSO RM, ARROYO V, CAMPS J, et al. 1984. Evidence that renal prostaglandins are involved in renal water metabolism in cirrhosis. *Kidney Int*, 26: 72-80.
- PHILIPP BW, SHAPIRO DJ. 1979. Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA reductase. *J Lipid Res*, 20: 588-593.
- PITA ML, FERNANDEZ MR, DeLUCCHI C, MEDINA A, MARTINEZ-VALVERDE A, UAUY R, GIL A. 1988. Changes in the fatty acids pattern of red blood cell phospholipids induced by type of milk, dietary nucleotide supplementation, and postnatal age in preterm infants. *J Ped Gastroenterol Nutr*, 7: 740-747.
- PITA ML, GIRON MD, PEREZ-AYALA M, DeLUCCHI C, MARTINEZ-VALVERDE A, GIL A. (en prensa)^a. Effects of postnatal age and diet on the fatty acid composition of plasma lipid fractions in preterm infants. *Clin Physiol Biochem*.
- PITA ML, DeLUCCHI C, FAUS MJ, GIL A. (en prensa)^b. Changes in the fatty acid profiles of red blood cell membrane phospholipids in human neonates during the first month of life. *Clin Physiol Biochem*.
- POLI G, DIANZANI MV, CHEESEMAN KH, SLATER TF, LANG J, ESTERBAUER H. 1985. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem J*, 227: 629-638.

- FOLLARD MR, GUNSTONE FD, JAMES AT, MORRIS LJ. 1980_a.
Desaturation of positional and geometric isomers of
monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat
livers. *Lipids*, 15: 306-314.
- FOLLARD MR, GUNSTONE FD, MORRIS LJ, JAMES JT. 1980_b. The
delta-5 and delta-6 desaturation of fatty acids of
varying chain length by rat liver: a preliminary report.
Lipids, 15: 690-693.
- FOYER JL, McCAY PB, LAI EK, JANZEN EG, DAVIS ER. 1980.
Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical
spin adduct detected by spin trapping during (¹³C)-
carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo.
Biochem Biophys Res Commun, 94: 1154-1160.
- PRASAD MR, DOMINICK LC. 1986. Effect of the peroxisomal
proliferator di (2-ethylhexyl)phthalate on component
reactions of the rat hepatic microsomal fatty acid chain
elongation system and on other hepatic lipogenic enzymes.
Arch Biochem Biophys, 248: 479-488.
- PUTNAM JC, CARLSON SE, DeVOE PW, BARNES LA. 1982. The effect
of variations in dietary fatty acids on the fatty acid
composition of erythrocyte phosphatidylcholine and
phosphatidylethanolamine in human infants. *Am J Clin
Nutr*, 36: 106-114.
- RECKNAGEL RO. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity.
Pharmacol Rev, 19: 145-208.
- RECKNAGEL RO. 1983a. Carbon tetrachloride hepatotoxicity:
status quo and future prospects. *Trends Pharmacol Sci*, 4:
129-131.

- RECKNAGEL RO. 1983_b. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lif Sci*, 33: 401-408.
- REITMAN S, FRANKEL S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, 28: 56-63.
- REYNOLDS E. 1963. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cells following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol*, 19: 139.
- RIELLA MC, BROVIAC JW, WELLS M, et al. 1975. Essential fatty acid deficiency in human adults during total parenteral nutrition. *Ann Intern Med*, 83: 786-789.
- RIVERS JPN, HASSAM AG, ALDERSON C. 1976. The absence of 6-desaturase activity in the cat. *Prod Nutr Soc*, 35: 67-68.
- SABESIN SM, HAWKINS HL, KUIKEN L, RAGLAND JB. 1977. Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 72: 510-518.
- SAMUELSSON B, GOLDYNE M, GRANSTRÖM E, HAMBERG M, HAMMARSTRÖM S, MALMSTEN C. 1978. Prostaglandins and thromboxanes. *Ann Rev Biochem*, 47: 997-1029.
- SARGENT J, HENDERSON RJ, TOCHER DR. 1989. The Lipids. In *Fish Nutrition*, Second Edition. JE Halver, editor. Academic Press INC, Washington, 153-217.
- SATO R, OMURA T. 1978. *Cytochrome P-450*. Academic Press, New York, 137-184.

- SEBEDIĆ JL, PARQUHARSON TE, ACKMAN RG. 1985. Quantitative analyses of methyl esters of fatty acid geometrical isomers, and of triglycerides differing in unsaturation, by the latroscan TLC/FID technique using AgNO_3 impregnated rods. *Lipids*, 20: 555-560.
- SHIBAYAMA Y. 1988. Hepatotoxicity of carbon tetrachloride after chronic ethanol consumption. *Exp Mol Pathol*, 49: 234-242.
- SIEDEL J, SCHLUMBERGER H, KLOSE S, ZIEGENHORN J, WAHLEFELD AW (Boehringer Mannheim GmbH). 1981. *J Clin Chem Clin Biochem*, 19: 838.
- SIMON JB, SCHEIG R. 1970. Serum cholesterol esterification in liver disease. Importance of lecithin-cholesterol acyltransferase. *New Engl J Med*, 283: 841-846.
- SINCLAIR HM. 1958. Essential fatty acids and the skin. *Br Med Bull*, 14: 258-261.
- SINCLAIR H. 1981. Are eskimos obligate carnivores? *Lancet*, 1: 1217.
- SKIPSKI VP, BARCLAY M. 1969. Thin-layer chromatography of lipids. In *Methods in Enzymology*. JM Lowenstein, editor. Academic Press, New York. 14: 548-550.
- SMUCKLER E, ARRHENIUS E, HULTIN T. 1967. Alterations in microsomal electron transport, oxidative N-demethylation, and azo-dye cleavage in CCl_4 and α -methylnitrosamine-induced liver injury. *Biochem J*, 103: 55-64.

- SMUCKLER EA, ARCASOY M. 1969. Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymal cells. *Intl Rev Exptl Pathol*, 7: 305-418.
- SMUCKLER E, KOPLITZ M, SELL S. 1976. Alpha-fetoprotein in toxic liver injury. *Cancer Res*, 36: 4558-4561.
- STAHLER F, GRUPER W, STINSHOFF K, ROLSCHLAU P. 1977. Practical enzymic cholesterol determination. *Med Lab*, 30: 29-37.
- STUELS CD, SMITH AD. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*, 779: 89-137.
- SVENSSON L. 1983. The effect of dietary partially hydrogenated marine oils on desaturation of fatty acids in rat liver microsomes. *Lipids*, 18: 171-178.
- THORNGREN M, GUSTAFSON A. 1981. Effects of 11-week increase in dietary eicosapentaenoic acid on bleeding time, lipids and platelet aggregation. *Lancet*, 2: 1190-1193.
- TOMASI A, BILLING S, GARNER A, SLATER TF, ALBANO E. 1983. The metabolism of halothane by hepatocytes: a comparison between free radical spin trapping and lipid peroxidation in relation to cell damage. *Chem B of Interact*, 46: 353-360.
- TRINDER P. 1969. *Ann Clin Biochem*, 6: 24.
- UAUY R, BIRCH E, TYSON J. 1989. Effect of omega-3 fatty acid (FA) on retinal function of very low birth weight neonates (VLBWN). Meeting SFR.

- VALCAZAR ALONSO A, HERRERA I, MUÑOZ CALVO R, LUCAS GALLEGO J. 1980. Efectos del tetracloruro de carbono sobre los lípidos hepáticos. Arch de Farmacol y Toxicol, 6: 75-82.
- VILLARRUEL MC, FERNANDEZ G, AGUILAR EG, CASTRO JA. 1987. Early biochemical alterations in liver mitochondria from carbon tetrachloride poisoned rats. J Appl Toxicol, 7: 173-177.
- VILLELA GG. 1964. Biochemical aspects of carbon tetrachloride poisoning. Biochem Pharmacol, 13: 665-676.
- WILCOX HG, DUNN GD, SCHENKER S. 1978. Plasma long chain fatty acids and esterified lipids in cirrhosis and hepatic encephalopathy. Am J Med Sci, 276: 293-303.
- WIRTE KW. 1974. Transfer of phospholipids between membranes. Biochem Biophys Acta, 334: 95-117.
- YAMAZOE Y, SUGIURA M, KAMATAKI T, KATO R. 1979. The apparent loss of cytochrome P-450 associated with metabolic activation of carbon tetrachloride. Japan J Pharmacol. 29: 715-721.
- ZIMMERMANN T, FRANKE H, DARGEL R. 1986. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. Exp Pathol, 30: 109-117.
- ZIPSER RD, HOEFS JC, SPECKART PF, et al. 1979. Prostaglandins: Modulators of renal function and pressor resistance in chronic liver disease. J Clin Endocrinol Metab, 48: 895-900.

ZIPSER RD, RADVAN GH, KRONBORG IJ, et al. 1983. Urinary thromboxane B₂ and prostaglandin E₂ in hepatorenal syndrome: Evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology*, 84: 697-703.

