

Metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos

Emilio Herrera y Miguel A. Lasunción

Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Alcalá de Henares,
y Servicio de Bioquímica
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

GENERALIDADES

Nomenclatura y aspectos estructurales de las lipoproteínas

Las lipoproteínas son agregados moleculares de lípidos y proteínas, que permiten el transporte de aquéllos por el torrente circulatorio. Además de esta función transportadora, ahora sabemos que las lipoproteínas juegan también un papel fundamental en todo el metabolismo lipídico del organismo, incluido el que tiene lugar intracelularmente.

La clasificación y nomenclatura de las lipoproteínas se basa en sus características fisicoquímicas y comportamiento en los procesos de su purificación. Así, por su desplazamiento en electroforesis de poliacrilamida, se diferencian las que

quedan en el origen (quilomicrones), y las que se desplazan a las posiciones que corresponden a las principales proteínas plasmáticas: las β -lipoproteínas, las pre β -lipoproteínas y las α -lipoproteínas. Estas mismas lipoproteínas, en función de su densidad (y por tanto, su flotación en la ultracentrifuga cuando el plasma se coloca en medio de diferentes densidades), se denominan: quilomicrones ($d < 1.006$, $Sf > 400$), VLDL ($d < 1.006$, $Sf > 20-400$), LDL ($d < 1.063 > 1.063$, $Sf 0-20$) y HDL ($d < 1.21 > 1.063$). Junto a estas fracciones existen también partículas intermedias remanentes de quilomicrones e IDL, y subfracciones o subpoblaciones de las principales lipoproteínas, particularmente de las HDL y las VLDL.

Lógicamente, las diferentes características fisicoquímicas y comportamiento en los procesos de su purificación se basa en diferencias en su composición y tamaño, los cuales se especifican en la tabla I. La parte proteica está constituida por las denominadas «apoproteínas» (o «apos»), las cuales, además de ser muy heterogéneas en cuanto a su estructura, difieren entre sí de forma importante en

NOTA

Intencionadamente, la mayor parte de las referencias que se indican corresponden a publicaciones propias, donde se especifican los resultados aquí comentados. Para aquellos interesados en ampliar otros aspectos actualizados sobre la metodología o el metabolismo de las lipoproteínas se sugieren las excelentes revisiones aparecidas en dos volúmenes recientemente publicados (Refs. 14, 15).

su distribución entre unas lipoproteínas y otras y en su función.

Lipoproteínas ricas en triglicéridos

De acuerdo con su composición, las denominadas lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG) son los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Mientras que los primeros se sintetizan en el intestino y transportan los TG derivados de la dieta, las VLDL proceden del hígado, y transportan los TG de origen endógeno: tanto los formados en el hígado por esterificación de los ácidos grasos que le llegan de la circulación como los sintetizados en el propio órgano. Aquí vamos a resumir los principales aspectos del metabolismo de quilomicrones y de VLDLs, aunque le dedicaremos especial atención a las últimas por dos motivos principales:

— Porque son las partículas precursoras para la síntesis de las LDL, y la elevación de éstas en plasma se considera un importante factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

— Porque nuestra propia experiencia se ha centrado preferentemente en las VLDL, habiendo observado que el metabolismo de estas lipoproteínas juega un papel fundamental en el general de los TG circulantes, contribuyendo activamente a determinar el destino de éstos en los distintos tejidos.

De cualquier forma, el tema lo desarrollaremos preferentemente desde el

punto de vista de los TG que transportan esas lipoproteínas, dejando lo referente al colesterol para ser tratado en el capítulo siguiente.

METABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES

De forma muy esquemática, el metabolismo general de los quilomicrones se resume en la figura 1, y a continuación vamos a ir desglosando cada una de las partes que configuran ese esquema.

Los quilomicrones se sintetizan en intestino y constituyen la forma de vehicular los lípidos de la dieta a los distintos tejidos del organismo. Su tamaño depende de la cantidad de TG que contienen, y los ácidos grasos de éstos son función de los de la dieta, de forma que cambios en ésta modifican la naturaleza de aquéllos. En las fases de ayuno el intestino también sintetiza quilomicrones, pero de pequeño tamaño y probablemente utilizando para ello los lípidos biliares que son reabsorbidos. A estos quilomicrones de pequeño tamaño se les ha dado el nombre de «VLDLs intestinales», pero esta denominación ha caído ya en desuso por prestarse a confusión.

En la fase postprandial, el intestino sintetiza quilomicrones de gran tamaño, en forma de «partículas nacientes». Estas partículas contienen apoproteína B-48, que es imprescindible para la configuración del quilomacrón. También contienen otras apoproteínas, y en particular las del tipo A (Apo A-I, A-II y A-IV). A través de los espacios intersti-

TABLA I

Composición porcentual y tamaño de las principales lipoproteínas circulantes

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
Triglicéridos	90	65	3	2
Colesterol esterificado	2	10	50	20
Fosfolípidos	6	15	21	25
Colesterol libre	1	3	6	3
Proteínas	<1	7	20	50
Diámetro aprox. medio (Å)	2.000	1.000	150	100

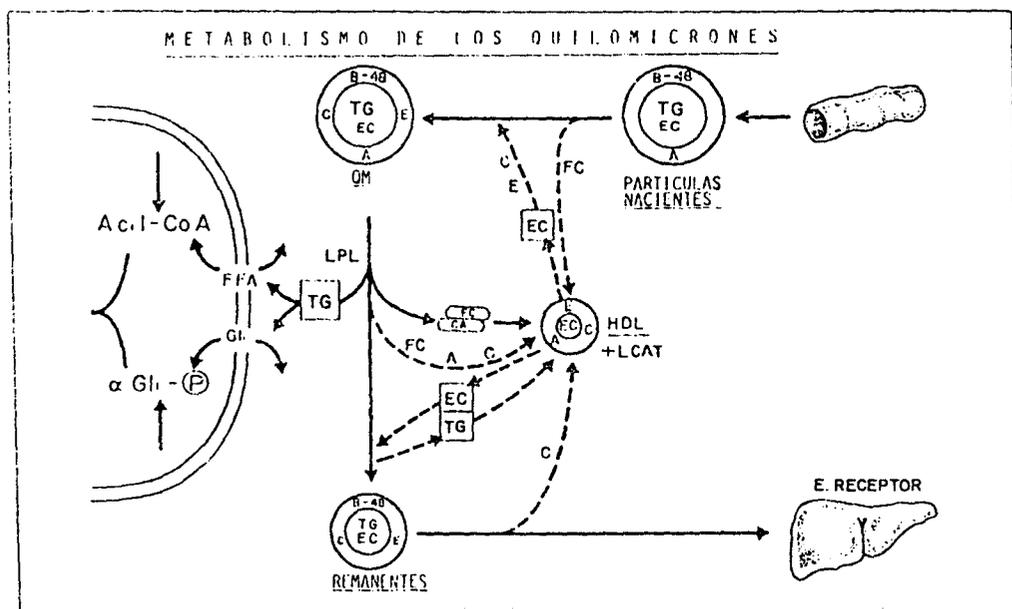


Fig. 1.—Esquema general del metabolismo de los Quilomicrones. EC = Colesterol libre; EC = Colesterol esterificado; TG = Triglicéridos; LPL = lipoproteína lipasa; LACT = Lecitina colesterol acil transferasa; C.E.A.F.B-48 = Apoproteínas.

ciales de las células de la mucosa intestinal, esas partículas nacientes son descargadas a los capilares linfáticos del plexo mesentérico, de donde pasan a los vasos linfáticos y finalmente al torrente sanguíneo a través del conducto torácico. En este trasiego, las partículas nacientes de quilomicrones van progresivamente intercambiando componentes con las HDLs, transformándose en los verdaderos quilomicrones que se encuentran en sangre.

Los principales intercambios que llevan a la configuración definitiva del «quilomicrón maduro» tienen lugar en sangre, y consisten en pérdida de colesterol libre, apoproteínas A-I, A-II y A-IV y de fosfolípidos, con ganancia de colesterol esterificado y de apoproteínas E y C. En este intercambio participa la enzima denominada LCAT (lecitina colesterol acil transferasa), ya que facilita la esterificación de colesterol en las HDL a expensas de las lecitinas, que en la reacción son transformadas en lisolecitinas. Se conoce que precisamente esta reacción de la LCAT sobre el colesterol

libre que llega a las HDL favorece el buen funcionamiento de todo el proceso de intercambio de componentes entre las partículas nacientes de quilomicrones y las HDL (fig. 1).

La ganancia de apoproteínas C-II y E permite otros dos pasos fundamentales en el metabolismo de los quilomicrones:

— La presencia de apo C-II en los quilomicrones hace que puedan ser reconocidos como substratos para la lipoproteína lipasa (LPL). Ya trataremos más adelante con detenimiento la acción de esta enzima, y aquí nos limitaremos a indicar que hidroliza a los TG que se encuentran en la parte interna de los quilomicrones, dando lugar a la formación de ácidos grasos libres (FFA) y glicerol, que son captados por el tejido subyacente o quedan libres en sangre.

— La presencia de apo E en los quilomicrones permite su posterior reconocimiento por los receptores E hepáticos. El que el quilomicrón maduro posea también apoproteínas C-I y C-III permite que la apo E esté como «enmascarada»

para poder ser reconocida por sus receptores hepáticos. De hecho éstos no reconocen al quilomión hasta que no se haya depleccionado de dichas apoproteínas C-I y C-III, lo cual ocurre cuando el quilomión se ha transformado en «remanente».

La transformación de quilomiones en remanentes tiene lugar cuando aquéllos son atacados por la LPL, perdiendo parte del material que contienen en su núcleo (los TG). Ello hace que la partícula vaya cambiando de configuración, apareciendo alteraciones importantes en su superficie (protuberancias e invaginaciones) que le dan una gran inestabilidad y facilitan que se vayan desprendiendo componentes de ella tales como fosfolípidos, colesterol libre y apoproteínas C y E. Estos componentes de la superficie de los quilomiones son transferidos a las HDLs, sobre las que actúa la LCAT. El proceso es aún más complejo, con intercambio de colesterol esterificado y de TG por mediación de la denominada «proteína transferidora de colesterol», y conlleva incluso la formación de «partículas discoideas», que no son más que «desgarros de la superficie de los quilomiones», las cuales son posteriormente transformadas en HDL en un proceso dependiente de LCAT (fig. 1).

Tras los intercambios y transformaciones que soportan los quilomiones por acción de la LPL, y con la participación de la LCAT de la forma que hemos comentado anteriormente, aquéllos quedan configurados en remanentes de menor tamaño (pueden alcanzar hasta 1/25 del tamaño del quilomión de procedencia) y mayor densidad. Estos remanentes se encuentran proporcionalmente empobrecidos de apoproteínas C y enriquecidos en apo E. Esta configuración les permite ser reconocidos por los receptores E hepáticos para su posterior catabolismo. De esta forma, los remanentes de quilomiones facilitan la vehiculación de una considerable proporción de colesterol circulante (principalmente en forma de colesterol esterifica-

do) al hígado, contribuyendo así a su posterior eliminación en forma de ácidos biliares.

METABOLISMO DE LAS VLDL

Síntesis de las VLDL

Nosotros hemos observado que la eliminación funcional del hígado produce una inmediata disminución de los niveles de TG circulantes, y este efecto se produce de forma simultánea en los TG asociaciones a las VLDL, mientras que no se modifican las concentraciones de otras lipoproteínas¹. Este tipo de experimentos demuestra que la principal fuente de VLDL en el organismo es el hígado. Mediante experimentos de trasplante hepático en el cerdo², y de hepatectomía y administración de trazadores radiactivos en la rata^{3,4}, hemos demostrado que una considerable proporción de los TG que exporta el hígado en forma de VLDL se sintetiza a partir de los productos que le llegan de la lipólisis del tejido adiposo, ácidos grasos, grasos libres (FFA) y glicerol. Estos compuestos se unen en el hígado a los de síntesis en el propio tejido, y ellos a su vez pueden ser utilizados por otras vías metabólicas (por ejemplo, β -oxidación en el caso de los FFA y gluconeogénesis en el del glicerol). De forma esquemática, estas interacciones metabólicas se resumen en la figura 2. Es obvio pensar que el flujo hacia unas y otras vías de estos metabolitos, o la propia actividad de aquéllas depende de muchos factores (situación endocrina, dieta, etc.), y ello determina a su vez la actividad de síntesis de las VLDL.

Metabolismo de las VLDL en sangre

Como se resume en la fig. 3, las VLDL recién sintetizadas salen a sangre en forma de partículas nacientes, que contienen preferentemente apo-B-100 y una pequeña proporción de apo-Cs. En plas-

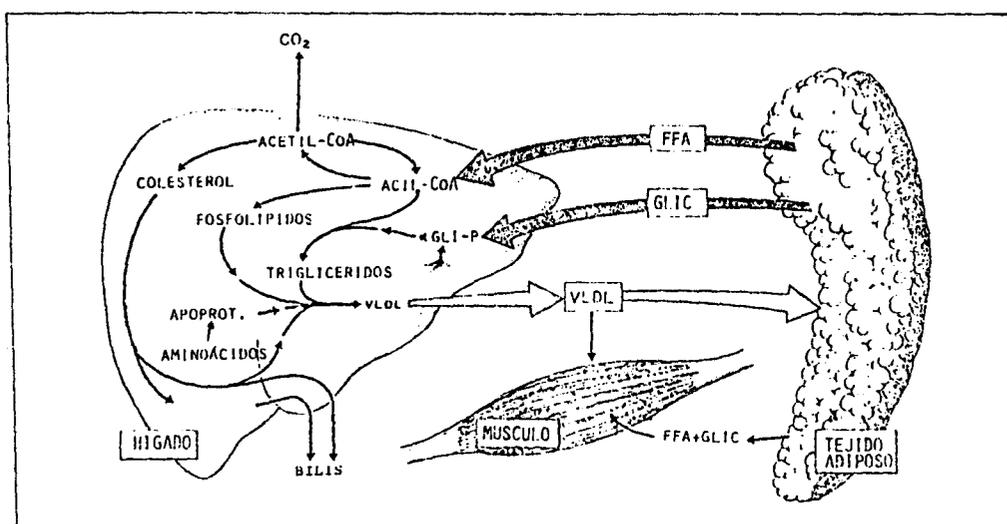


Fig. 2.—Interrelaciones entre tejido adiposo e hígado en la síntesis de VLDL.

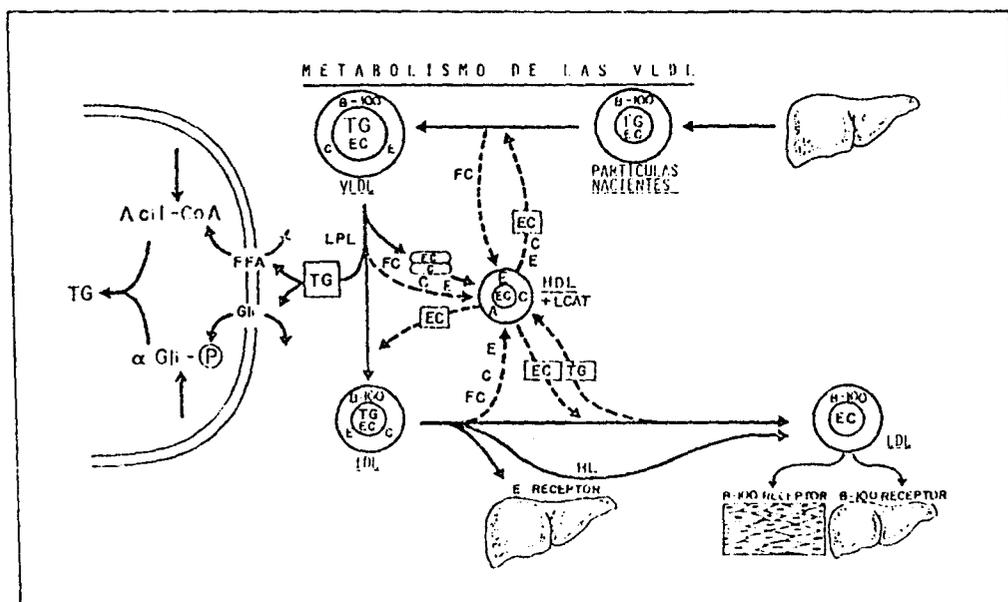


Fig. 3.—Esquema del metabolismo de las VLDL. EC = Colesterol libre; EC = Colesterol esterificado; LPL = Lipoproteína lipasa; HL = Lipasa hepática; LCAT = Lecitín colesterol acil transferasa. Las letras corresponden a las principales apoproteínas que participan en el proceso.

ma las partículas nacientes de VLDL maduran mediante el intercambio de componentes con otras lipoproteínas circulantes, y en particular las HDL que le ceden apos-C (particularmente la apo-CII) y -E y colesterol esterificado, mien-

tras que ellas les transfieren colesterol libre y fosfolípidos.

Cuando se administran VLDL-C14 a ratas hepatectomizadas se observa que tras su desaparición de la circulación, aparecen lipoproteínas de densidad su-

circulantes hacia la síntesis de leche poco antes del parto, en preparación para la lactancia. Esta interpretación concuerda con los datos obtenidos por nosotros en la rata gestante tratada con progesterona durante los tres días anteriores al parto. Dicha progesterona impide que se produzca el incremento de prolactina que normalmente tiene lugar en esta fase última de la gestación, y ello impide a su vez que se induzca la formación de LPL en la glándula mamaria, haciendo que los elevados niveles circulantes de TG en la madre se mantengan permanentemente elevados⁸.

— Es conocido que la insulina induce la actividad LPL en tejido adiposo, mientras que la inhibe en corazón y pulmón. Tras la administración intravenosa a ratas funcionalmente hepatectomizadas de VLDLs marcadas con C14 en los ácidos grasos esterificados de sus glicéridos, se observa que cuando los animales son tratados con insulina aumenta la cantidad de radiactividad en tejido adiposo, mientras que disminuye la de corazón y de pulmón¹. Es interesante resaltar también que en estos experimentos se observó que mientras la mayor parte de radiactividad presente en tejido adiposo se encontraba en forma de ácidos grasos esterificados en corazón y pulmón una considerable proporción aparecía en forma de ácidos grasos libres¹. Cabe indicar aquí que en tejido adiposo los ácidos grasos que se captan van destinados preferentemente a acumulo en forma de triglicéridos, mientras que en corazón se utilizan como fuente de energía tras su oxidación, y en pulmón para la síntesis de surfactante. Así pues, los cambios y la propia dirección de estos que tienen lugar en la actividad LPL en cada uno de esos tejidos permite la canalización de los triglicéridos para los destinos arriba indicados. Esta interpretación concuerda con dos hechos experimentales bien contrastados:

- Una disminución de los niveles de TG en plasma produce un incremento de la actividad LPL en corazón¹⁰. Nor-

malmente esa disminución de niveles de TG circulantes coincide con la presencia de hipoglucemia en el individuo, como es el caso del ayuno; es decir, una situación en la que el consumo de glucosa por el tejido cardíaco está restringido, y el incremento de utilización de ácidos grasos derivados de los TG.

- Un intenso incremento de actividad LPL en pulmón fetal poco antes del nacimiento, alcanzando rápidamente la actividad del adulto¹¹ indica la necesidad de la presencia de esta enzima para la adecuada maduración y funcionamiento de este órgano.

— Otro ejemplo de la relación existente entre actividad LPL en tejido y la canalización y destino de los TG circulantes en el mismo la hemos encontrado en el hígado de la rata recién nacida. En contra de lo que ocurre en adultos, alrededor del nacimiento se observa la presencia de actividad LPL en hígado. Todos los esfuerzos dirigidos a la caracterización de esta enzima demuestran que se trata realmente de LPL y no de lipasa hepática¹². Esta actividad aumenta en el hígado al nacer, y de forma particular cuando los animales se mantienen en ayunas; una situación en la que disminuye la concentración de TG en hígado y en plasma, y se incrementa la producción de cuerpos cetónicos. Además, se observa una correlación inversa entre los niveles de TG circulantes y la actividad LPL en hígado de estos recién nacidos sometidos a distintos períodos de ayuno¹³. Todo ello permite sugerir que la inducción de LPL hepática alrededor del nacimiento favorece que el hígado capte TG circulantes, a pesar de los bajos niveles de lipoproteínas ricas en TG en plasma. El mecanismo es de enorme utilidad metabólica, ya que en esta etapa perinatal existe hipoglucemia a pesar de que el recién nacido utiliza los depósitos de glucógenos acumulados durante la última fase de la vida intrauterina. Ello se debe a que las enzimas gluconeogénicas no empiezan a inducirse hasta después del nacimiento, y los principales

substratos disponibles son los TG derivados de la leche materna. Así, la aparición de actividad LPL en el hígado garantiza la llegada al tejido de esos TG circulantes para su hidrólisis y consumo de los productos de la misma: glicerol para la síntesis de glucosa, y FFA para su oxidación. Teleológicamente cabe pensar que el incremento de actividad de LPL hepática que se observa en ayunas es una garantía para el adecuado funcionamiento de estas vías metabólicas, a pesar de la disminución en los niveles circulantes de TG que ello supone. En cierto modo, la situación es semejante a la que ocurre en corazón del adulto comentada más arriba, aunque mientras que en este caso el tejido utiliza únicamente los FFA derivados de los TG circulantes para su oxidación y producción endógena de energía, el del hígado del recién nacido utiliza los productos de dicha acción de la LPL sobre los TG para la producción de metabolitos que son preferentemente exportados fuera del tejido para ser consumidos por los tejidos extrahepáticos: glucosa y cuerpos cetónicos.

RELACIONES ENTRE ACTIVIDAD LPL Y TG CIRCULANTES EN HUMANOS

Al igual que ocurre en animales experimentales, en humanos se observa una estrecha relación entre la actividad LPL y los niveles de TG circulantes. Dado que la enzima se encuentra anclada al endotelio de los capilares, la determinación de su actividad en plasma se realiza tras su «solubilización» mediante la administración intravenosa de heparina (50 UI/kg). Como cabría esperar, en condiciones fisiológicas se observa en humanos una relación inversa entre actividad LPL postheparínica (LPL-PH) y los niveles de TG circulantes. Así, nosotros hemos observado recientemente que la LPL-PH en niños es más alta que en adultos, mientras que los niveles de

TG en plasma varían de forma inversa: bajos en niños y altos en adultos.

Existen situaciones patológicas en las que la actividad LPL-PH es muy baja, lo que da lugar a hipertrigliceridemia. El caso es particularmente llamativo en las hiperlipoproteinemias del tipo I, que por un error congénito (autosómico recesivo) en la síntesis de la enzima, la actividad LPL-PH llega a ser prácticamente indetectable, dando lugar a que los niveles de TG en sangre alcancen valores muy elevados (de 1.000 a 6.000 mg/dl, mientras que en condiciones normales la cifra no supera los 100 mg/dl). Nosotros hemos observado que además de la ausencia de LPL-PH y del incremento en los niveles circulantes de TG asociados a VLDL, estos pacientes presentan valores muy bajos de LDLs y HDLs, lo cual pone de manifiesto el importante papel de esta enzima no sólo en el catabolismo de las VLDLs, sino en el metabolismo general de todas las lipoproteínas. Es interesante hacer notar que se dan situaciones en las que pacientes con dislipemia del tipo I presentan niveles normales de VLDL-TG en plasma debido de tratamientos dietéticos, y únicamente pueden ser diagnosticados por la ausencia de actividad LPL-PH. Ello, junto a la posibilidad de determinar las características genéticas de la enfermedad mediante la detección de valores bajos de LPL-PH en familiares consanguíneos del paciente, pone de manifiesto la importancia diagnóstica del ensayo de dicha actividad LPL-PH.

ESQUEMA GENERAL DEL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS Y RESUMEN

En la tabla II hemos resumido los cambios que se observan en la actividad LPL en distintos tejidos por diversos factores hormonales y nutricionales, así como en situaciones fisiológicas, tales como la gestación y el desarrollo postnatal. El destino metabólico de los TG cap-

TABLA II

Modulación fisiológica de la actividad LPL en distintos tejidos y destino de los triglicéridos en ellos

Tejido	Efecto sobre LPL*	Destino de los triglicéridos
Tejido adiposo	Insulina	Reserva
	Ayuno	
	Gestación	
Corazón y músculo esquelético	Insulina	Oxidación
	Triglicéridos	
	Glucocorticoides	
Glándula mamaria	Prolactina	Lípidos de leche
Hígado del recién nacido	Insulina	Oxidación
	Triglicéridos	
Pulmón	Desarrollo	Síntesis surfactante
	Insulina	

* La modulación de la actividad LPL por los factores que se indican no se realiza de forma directa en todos los casos, y ello puede dar lugar a cambios en sentido distinto al indicado como resultado de la acción de efectores más directos, los cuales son aún desconocidos.

tados en cada uno de esos tejidos varía en función de las características fisiológicas de aquéllos: reserva en el caso del tejido adiposo, oxidación en el corazón y músculo esquelético en adultos y en el hígado de recién nacidos, producción de leche en glándula mamaria y síntesis de surfactante en el pulmón. Los resultados aquí comentados ponen claramente de manifiesto que la actividad LPL en estos tejidos y los cambios que en ella se producen por los factores arriba indicados y otros, tanto fisiológicos como patológicos, determinan el destino metabólico de los TG en los distintos tejidos y modulan sus niveles circulantes.

No podemos terminar sin hacer hincapié en el hecho de que el metabolismo de todas las lipoproteínas circulantes se encuentra íntimamente interrelacionado entre sí. De forma esquemática esta interrelación la resumimos en la figura 4. En ella vemos cómo en el metabolismo de las lipoproteínas pueden diferenciarse cuatro etapas bien definidas:

— Origen, constituido por los procesos de síntesis que tienen lugar en intestino e hígado, y en el que se forman las «partículas nacientes».

— Metabolismo circulante o periférico, en el que se configuran las «particu-

las maduras» mediante el intercambio de componentes de unas lipoproteínas a otras.

— Catabolismo, por el que dichas «partículas maduras» son convertidas en el propio torrente circulatorio en lipoproteínas destinadas a ser eliminadas (quilomicrones en remanentes y VLDL en IDL y LDL).

— Eliminación del torrente circulatorio, que tiene lugar mediante el reconocimiento de esos productos del catabolismo por receptores específicos en diversos tejidos, y su posterior internalización.

Es obvio pensar que cualquier alteración en alguna de estas etapas conlleva un desequilibrio en el perfil lipoproteico circulante del individuo, desencadenando el desarrollo de una dislipoproteíemia primaria o secundaria, y su correspondiente riesgo patológico (particularmente las enfermedades cardiovasculares en el caso de las hipercolesterolemias). Por ello es necesario no escatimar esfuerzos para alcanzar un mejor conocimiento de estos procesos, para la detección precoz de los factores que desencadenan dicho desequilibrio, y para establecer los adecuados remedios terapéuticos que permitan subsanarlos de forma eficaz.

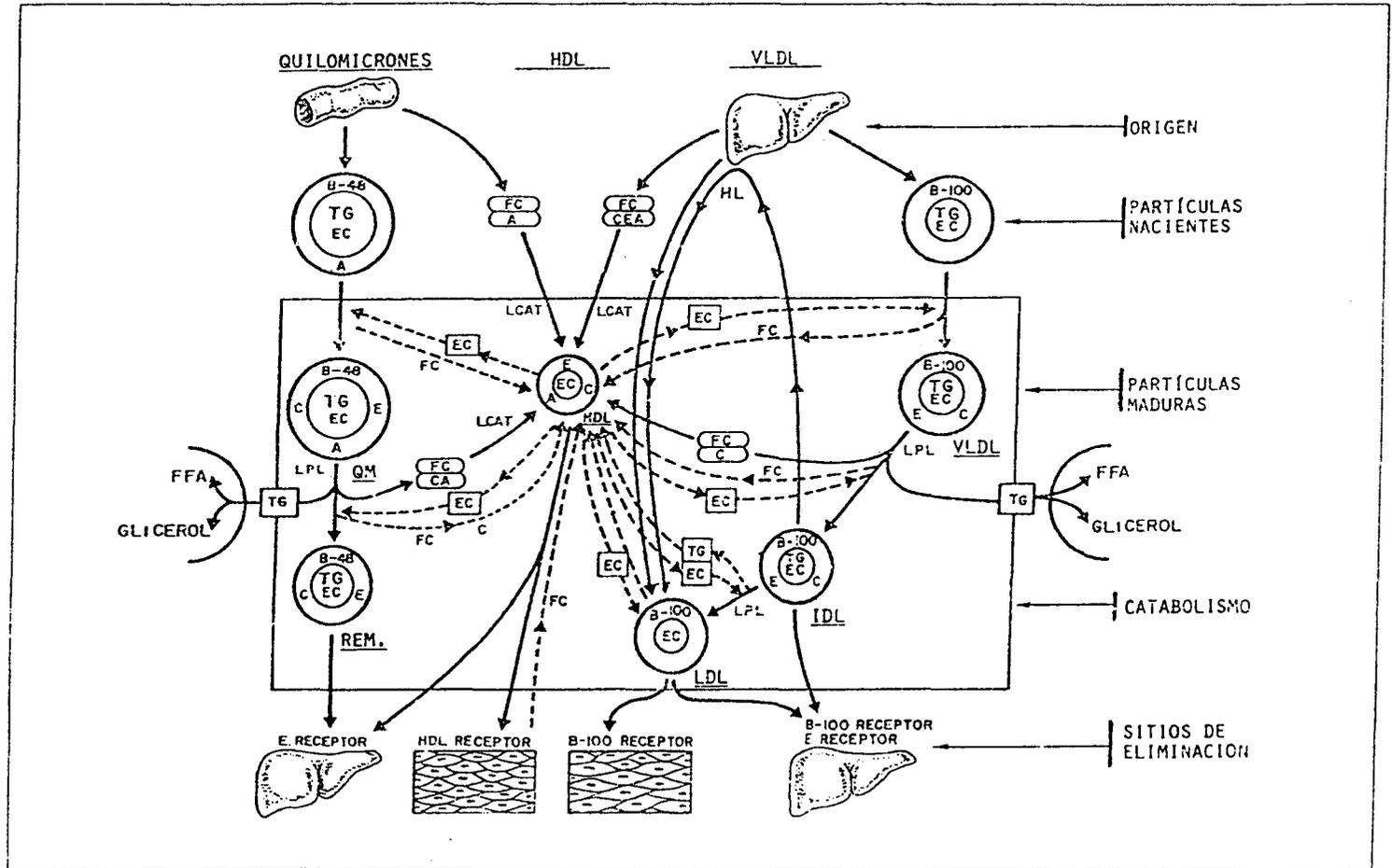


Fig. 4.—Esquema general de las interrelaciones entre las distintas lipoproteínas circulares. Las abreviaturas utilizadas son las mismas que en las figuras anteriores.

BIBLIOGRAFIA

1. ARGILÉS, J. y HERRERA, E.: *Diabetología*, 24: 300-303, 1983.
2. MAMPEL, T.; CAMPRDÓN, R.; SOLSONA, J.; JUNCÁ, V., y HERRERA, E.: *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 89:195-199, 1981.
3. CARMANU, S., y HERRERA, E.: *Diabetes & Metabolism*, 6:239-244, 1980.
4. MAMPEL, T., y HERRERA, E.: *Diabetes & Metabolism*, 11:118-124, 1985.
5. LASUNCIÓN, M. A., y HERRERA, E.: *Biochem. J.*, 210:639-643, 1983.
6. HERRERA, E., y LASUNCIÓN, M. A.: Ed: *Bioquímica y Biología Molecular*. S. Ochoa, L. F. Leitoir, J. Oro y A. Sols, eds., Ed. Salvat, Barcelona, 166-172, 1986.
7. LASUNCIÓN, M. A.; LLOBERA, M., y HERRERA, E.: *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 89:57-62, 1981.
8. RAMÍREZ, I.; LLOBERA, M., y HERRERA, E.: *Metabolism*, 32:333-341, 1983.
9. ARGILÉS, J., y HERRERA, E.: *Metabolism*, en prensa.
10. GARTINKEL, A. S.; KEMPNER, E. S.; BEN-ZEEV, O.; NAKLY, J.; JAMES, S. J., y SCHIOTZ, M. C.: *J. Lipid. Res.*, 24:775-780, 1983.
11. LLOBERA, M.: En: *Bioquímica Perinatal*. E. Herrera, ed., Fundación Ramón Areces, Madrid, 185-211, 1986.
12. LLOBERA, M.; MONTES, A., y E. HERRERA: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 91:272-277, 1979.
13. GRIMBERG, D.; RAMÍREZ, I.; VILARÓ, S.; REINA, M.; LLOBERA, M., y HERRERA, E.: *Biochem. Biophys. Acta*, 833:217-222, 1985.
14. SEGREST, J. P., y ALBERS, J. J. eds.: Plasma Lipoproteins. Part. A. Preparation, Structure, and Molecular Biology. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 128. Academic Press, Nueva York, 1986.
15. ALBERS, J. J., y SEGREST, J. P. eds.: Plasma Lipoproteins. Part. B. Characterization, Cell Biology and Metabolism. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 129. Academic Press, Nueva York, 1986.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se ha realizado con la valiosa colaboración de los doctores J. Argilés, doctor Gómez Coronado, Grinberg, M. A. Lasunción, M. Llobera, A. Martín, E. Orozco e I. Ramírez, con la excelente asistencia técnica de las señoritas A. Aguilar, M. Morante y M. A. Muria, y con ayudas de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.