ESTUDIO DE LOS LIPIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN LA ESPECIE HUMANA DURANTE LA ONTOGENESIS

FRANCISCO GONZÁLEZ-SASTRE, TERESA PÁMPOLS
y JUAN SABATER

INTRODUCCIÓN

Con la maduración, la composición química del sistema nervioso central varía en todas las especies que han sido estudiadas. Las transformaciones histológicas que se habían observado mediante la microscopia óptica y la microscopia electrónica se producen sobre un sustrato bioquímico y se detectan en forma de grandes variaciones de la distribución de las diversas sustancias componentes de la trama fisioquímica del tejido. En el curso de la maduración, los cambios bioquímicos de los tejidos se anticipan a los estructurales-morfológicos, de modo que el estudido de la composición química del tejido nervioso en el curso de la maduración pone de manifiesto características que, añadiendo una nueva dimensión, amplían la secuencia de procesos de desarrollo y maduración, al mismo tiempo que permite establecer las características químicas y fisicoquímicas de las nuevas estructuras.

Las enfermedades hereditarias del sistema nervioso han sido estudiadas extensamente mediante la clasificación de signos y síntomas clínicos, las características genéticas de su transmisión y también en su aspecto histopatológico. Más recientemente en varias escuelas se han aplicado las modernas técnicas bioquímicas para el estudio de las enfermedades llamadas degenerativas, lo que ha posibilitado la caracterización de un cierto número de ellas.

Por las razones indicadas, la composición química del encéfalo, y en especial su maduración, han sido en estos últimos años objeto de numerosos estudios que han dado resultados de gran significación para la comprensión de los mecanismos implicados en su función y para la caracterización de un cierto número de enfermedades cuya etiología o patogenia son de carácter predominante bioquímico.

Los abundantes datos que en la actualidad son conocidos y utilizados en los estudios del sistema nervioso en su vertiente biológica o en la patología

del mismo, corresponden en su mayoría a animales de experimentación. La información sobre el sistema nervioso del humano es mucho menos numerosa y muy escasa con respecto a los primeros estadios de la maduración.

La falta de datos representativos para la composición normal del tejido nervioso humano constituye sin duda una limitación a aquellos estudios de significación predominantemente patológica. Es preciso señalar, sin embargo, la contribución de numerosos autores que desde el año 1948 [1, 2] hasta nuestros días han aportado buen número de estudios concernientes al cerebro humano en la vida posnatal.

Con respecto al desarrollo del sistema nervioso en el período prenatal, el número de casos estudiados es reducido. Los trabajos de SVENNERHOLM [3] y de CLAUSEN y col. [4] aportan datos sobre la composición lipídica del cerebro fetal que permiten deducir la existencia de grandes cambios, especialmente en las últimas semanas de la gestación. Según estos autores, el colesterol y los fosfolípidos son las especies moleculares más abundantes al final del primer trimestre, alcanzando valores de 9 y 18 micromoles por gramo de tejido respectivamente. Entre los fosfolípidos la lecitina (fosfatidil colina) representa aproximadamente un 50 %. En el feto a término los fosfolípidos alcanzan entre 30 y 35 micromoles, y el colesterol alcanza entre 18 y 20 micromoles. La cantidad de cerebrósidos es indetectable durante el primer trimestre, observndose la presencia de cantidades muy pequeñas en el período hasta el término de la gestación. Debe hacerse notar que estos autores limitaron su estudio al cerebro. CLAUSEN y col. y también MENKES encuentran cantidades apreciables de cerebrósidos en esta víscera, que según este último autor alcanzan un 0,5 % del total lipídico.

Los cambios en la concentración de gangliósidos en la maduración del cerebro han sido registrados en varios trabajos. La curva que expresa la relación entre la proporción de las fracciones mayores de gangliósidos ha sido expuesta por SUZUKI [5] en el cerebro de la rata y por HOOGHWINKEL [6] en el cerebro bovino. Los datos con respecto al cerebro humano son pocos e incompletos [7], y muy especialmente para el período más temprano del desarrollo, en el que precisamente existe una mayor actividad en los sistemas de síntesis de estos compuestos. Por otra parte, se ha sugerido repetidamente que el conocimiento detallado de los cambios madurativos en cada una de las fracciones de gangliósidos facilitarían la elucidación de su localización morfológica y la relación metabólica que exista entre cada una de las fracciones.

Según SVENNERHOLM, los cambios en concentración de los gangliósidos en el período fetal son muy marcados. El porcentaje molar del ganglósido GD_1a aumenta 2,5 veces entre las semanas 10 y 30, disminuyendo gradualmente hasta la edad adulta. La fracción GM_1 sufre una variación de sentido inverso al anterior: disminuye desde la semana 10 a la 30 de vida fetal y aumenta después progresivamente hasta alcanzar el nivel adulto. Los perfiles madurativos de las fracciones GD_1b y GT_1 difieren de las dos fracciones anteriores. Se registra un aumento en forma de pico entre la 14 y 15 semana. GT_1 alcanza un máximo algo superior al 30 % en proporciones molares. Después, las fracciones GT_1 y GD_1b disminuyen marcadamente hasta el final de la gestación. Las proporciones de los distintos gangliósidos en cerebelo, según

estos autores, serían similares a las observadas en el cerebro, aun cuando reconocen que la escasez de material estudiado no permite establecer conclusiones definitivas.

Con el presente trabajo se aportan datos correspondientes a la maduración del sistema nervioso central desde las 18 semanas de gestación hasta la edad dcorrespondiente al término de la gestación. El trabajo comprende la evaluación de trece criterios bioquímicos durante el período indicado sobre ocho regiones anatómicas y en treinta y cinco casos de recién nacidos prematuros.

Material y métodos

Material

El material biológico fue obtenido del Instituto Provincial de Prematuros, Laboratorio de Anatomía Patológica. Los 35 casos que se han elegido para la confección de las tablas y gráficas de resultados del presente estudio comprenden 25 diagnosticados de atelectasia pulmonar (falta de expansión pulmonar), 2 de hemorragia pulmonar, 2 de aspiración del líquido amniótico, 2 de neumonía, 1 de bronconeumonía necrotizante y uno sin diagnóstico. Los tejidos sobre los que se realizó el estudio bioquímico fueron considerados como normales desde el punto de vista del examen histopatológico.

Las muestras recibidas en el laboratorio fueron inmediatamente diseccadas en regiones anatómicas y después de separar cuidadosamente las membranas meníngeas fueron pesadas. Usualmente las muestras recibidas se trataron inmediatamente con los métodos indicados de extracción y análisis. En algunos casos se conservaron a — 15° C durante un período no superior a una semana.

Las regiones anatómicas estudiadas fueron:

— *Lóbulo frontal,* comprendiendo la porción anterior del cerebro desde el extremo anterior hasta la cisura de Rolando.

— *Lóbulo occipital,* comprendiendo desde el extremo posterior del hemisferio hasta un plano frontal en el límite posterior de la cisura de Silvio.

— *Lóbulo temporal,* que comprende la porción inferior a la cisura de Silvio, limitada por la parte posterior por el plano de separación anterior del lóbulo occipital.

— *Lóbulo parietal,* que comprende la porción situada por encima de la cisura de Silvio, limitada anteriormente por la cisura rolándica y posteriormente por el límite anterior de la porción denominada lóbulo occipital.

— *Núcleos,* comprendiendo la porción central del hemisferio e incluyendo tálamo óptico, y los núcleos basales lenticular y caudado. Esta porción es menos definida que las anteriores debido a la dificultad de delimitación en el cerebro no mielinizado y probablemente su disección no es reproducible variando la proporción de las diversas estructuras que se encuentran en esta región central del hemisferio cerebral.

— *Cerebelo,* comprendiendo con exactitud el órgano de esta denominación.

— *Tronco,* que comprende pedúnculos cerebrales, pedúnculos cerebelosos, protuberancia y bulbo.

— *Médula,* que comprende el órgano anatómico de esta denominación.

MÉTODOS

Pesadas y determinación del contenido hídrico. — Se toman partes alícuotas de aproximadamente 1 g. de las regiones cerebrales y 100 mg. de las regiones mesencefálicas y medular y se pesan cuidadosamente.

Seguidamente se someten a desecación al vacío en un desecador conteniendo Cl_2Ca. La desecación se repite hasta obtener una pesada constante.

El resto del tejido se pesa y se somete a extracción lipídica después de tomar una fracción alícuota para efectuar la determinación de DNA y RNA.

Extracción lipídica. — La extracción lipídica se realiza con cloroformo metanol en la proporción 1:1. Aunque el método original de Folch para extracción lipídica emplea la proporción de solventes cloroformo 2, metanol 1, v/v, hemos disminuido la proporción de cloroformo para aumentar la polaridad del solvente atendiendo a la observación de SUZUKI que demuestra la extracción incompleta con aquel solvente de los gangliósidos de carácter más polar. El residuo insoluble se lava seguidamente con la mezcla cloroformo metanol 2:1 por dos veces. A continuación los extractos y los lavados se combinan y se añade cloroformo en cantidad suficiente para conseguir la proporción cloroformo-2 metanol-1 en el extracto total.

Lavado del extracto y separación de la fracción lipídica hidrosoluble. — Siguiendo el procedimiento de Folch, se añaden 0,2 volúmenes de agua destilada al extracto total, ocasionando la formación de un sistema bifásico formado por una fase superior acuosa (de carácter polar) y una fase inferior clorofórmica. En la fase superior se encuentran los gangliósidos y en la fase inferior se encuentra la gran fracción lipídica del tejido.

La fase superior se obtiene por simple aspiración y la fase inferior se lava dos veces por adición de una fase superior teórica conteniendo ClK 0,8 M : metanol : cloroformo, 48 : 47 : 1, v/v y aspiración de la fase superior resultante. La fase inferior lavada se homegeniza por adición de unas gotas de metanol. La fase inferior así lavada se la denomina extracto total lipídico, siguiendo la nomenclatura de Folch.

Tratamiento de la fase superior. — La fase superior obtenida en el procedimiento anterior se coloca en una bolsa de diálisis y se coloca en agua corriente durante tres días y en agua destilada durante 24 horas. Los dializados se liofilizan para su concentración y conservación hasta el momento del análisis. (Ver sección correspondiente a determinación de gangliósidos.)

ESTUDIOS SOBRE EL EXTRACTO TOTAL LIPÍDICO

Determinación de lípidos totales — Se toma una porción alícuota del extracto total lipídico y se somete a evaporación por acción de una corriente de nitrógeno manteniendo la temperatura entre 37° C y 40° C. Una vez evaporado, se coloca en un desecador de vacío en presencia de NaOH. Después de 24 horas se pesa el residuo seco. El material pesado corresponde al total de lípidos del tejido (excepto la pequeña porción de gangliósidos que se determinan por otro procedimiento), más los proteolípidos.

Determinación de las fracciones lipídicas mayores

Colesterol. — Su determinación se realiza según el método de Ferro y Ham. El método no distingue entre colesterol libre y colesterol esterificado; por lo tanto, los resultados se expresan como colesterol total. Sin embargo, la porción de colesterol esterificado en el tejido nervioso normal es muy pequeña, por lo que en general en el tipo de material estudiado es permisible la interpretación de los resultados como indicativos de las cantidades de colesterol libre presentes en el tejido.

La comprobación cromatográfica de la insignificancia de la proporción de esteres de colesterol con respecto a la fracción de colesterol libre (ver «Cromatografía de los esteres de colesterol»), hace todavía más plausible la interpretación indicada.

La reproductividad del método se ha comprobado por determinación de colesterol en una misma muestra de extracto lipídico de cerebro total en *siete días distintos. La desviación standard obtenida* de los siete resultados expresada en tanto por ciento fue de 3,35.

Fosfolípidos. — Los fosfolípidos totales se determinan por digestión de una parte alícuota del extracto total conteniendo en 0,5 y 8 μg. de fósforo y determinación del fosfato inorgánico en el digerido. El método elegido ha sido el de CHEN y cols. modificado, que utiliza la formación de ácido fosfomolíbdico a partir de molibdato amoníaco y en presencia de ácido ascórbico como reductor. El método se usa modificado para utilizar el ácido perclórico del digerido para producir una normalidad entre 0,4 y 1,2 óptima para el desarrollo del color. El método es de gran reproducibilidad. *La desviación standard obtenida en cinco muestras de un extracto lipídico fue de 3,45 %.*

Los valores en peso de fosfolípidos se obtienen por la aplicación del factor 25 a los valores obtenidos de fósforo. La aplicación del factor 1/30,9 resulta en los valores fosfolípidos en términos molares.

Galactolípidos. — Los cerebrósidos y los sulfátidos son lípidos que contienen en su molécula un mol de hexosa. Ambos compuestos permanecen en la fase inferior del sistema de partición de Folch y, por lo tanto, se hallan en el extracto lipídico total. Por el contrario, los gangliósidos, que son lípidos conteniendo en su molécula varios radicales de hexosa, pasan a la fase superior. El extracto lipídico total lavado no contiene gangliósidos, salvo en algunas condiciones patológicas en las que existe un aumento muy marcado de estas sustancias. Por lo tanto, y a excepción de las condiciones citadas, la determinación del contenido de hexosa en el extracto lipídico total refleja fielmente la concentración de los cerebrósidos y sulfátidos en el mismo.

La determinación de hexosa se ha realizado siguiendo el método propuesto por SORENSEN y HAUGAARD, que emplean el reactivo orcinol-ácido sulfúrico y obtienen una coloración anaranjada por incubación de las muestras con el reactivo a 100° C durante 18 min. Nosotros hemos introducido la modificación de diluir el color formado con la mezcla cloroformo-metanol en la proporción 1:1 v/v, con lo que cualquier sustancia de carácter liposoluble liberada en el proceso de incubación queda disuelta y, por lo tanto, se evitan los fenómenos de turbidez que interfieren en la lectura.

Los resultados obtenidos con las muestras procedentes de tejido nervioso mielinizado muestran una *desviación standard de 8,47 %* (número de muestras = 7). Los resultados de una muestra de tejido poco mielinizado en cuatro muestras por triplicado presentan una *desviación standard de 2,31 %.*

Determinación de proteolípidos. — Los proteolípidos son un tipo especial de proteínas que, entre otras características, se disuelven bien en solventes orgánicos tales como la mezcla de cloroformo y metanol 2:1. La determinación de estos compuestos se realiza por extracción de los mismos en este solvente y determinando el contenido proteico del extracto.

El método elegido para la determinación del contenido proteico del extracto clorofórmico ha sido el de Lowry, que emplea el reactivo de Folin y puede utilizarse para la determinación de material proteico insoluble en agua.

El procedimiento consta de una primera fase de solubilización en medio alcalino por incubación durante 24 horas en solución 0,5 N de NaOH y seguidamente una segunda fase en la que se realiza la reacción productora de color.

Los patrones utilizados por nosotros han sido soluciones de albúmina bovina. Las cantidades determinadas por el método oscilan entre 14 μg. y 70 μg. de proteína.

En *siete muestras* de tejido mielinizado se obtuvo una desviación standard correspondiente a *6,1 %*. En las muestras de tejido poco mielinizado tomando las muestras por triplicado la desviación standard fue de *4,6 %* (número de muestras = 5).

Métodos alternativos. — En alguna muestra la determinación del contenido en proteolípidos se ha realizado por lectura directa de la absorción ultravioleta del extracto lipídico total. El alto contenido en triptófano de estos compuestos proteicos permite su determinación por lectura de la absorción de las radiaciones de 280 nm. específica para este aminoácido. Los resultados obtenidos por este procedimiento son buenos en las muestras con un alto contenido en proteolípidos (los tejidos mielinizados), pero de resultados pobres en los tejidos escasamente mielinizados.

Determinación de esfingomielina y plasmalógenos. — Este grupo de lípidos se determinan atendiendo a su resistencia a la hidrólisis en medio alcalino. El método diseñado para determinar el grado de hidrólisis efectuada sobre una porción del extracto lipídico total consiste en la separación de los productos de hidrólisis, del resto de los lípidos, en un sistema bifásico de cloroformo, metanol y agua de proporciones similares al de Folch y col.

Procedidmiento: Las muestras a estudiar conteniendo entre 100 μg. y 200 μg. de P se colocan por duplicado en tubos provistos de tapón. Los solventes es evaporan por acción de una corriente de N_2. A cada tubo se añade 0,75 ml. de metanol, 0,5 ml. de agua y 100 μl. de NaOH 1N. Se incuban a 37° C durante 1 hora.

Pasado el período de incubación se añade 1,5 ml. de cloroformo a cada tubo y se agita vigorosamente. Seguidamente los tubos se centrifugan separando las dos fases. Se toman duplicados de cada una de las fases para la determinación de su contenido de fósforo.

Las muestras estudiadas se analizan por duplicado, resultando en la obtención de cuatro valores para cada muestra.

Los resultados se expresan como tanto por ciento del fósforo total de la muestra.

El estudio de los valores individuales (ningún duplicado) obtenidos de una muestra de tejido mielinizado, indica un promedio de 37,11 % de fosfolípidos resistentes a la acción de álcali con una desviación standard de 2,23 %.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Separación de las fracciones mayores fosfolipídicas, el colesterol, cerebrósidos y sulfátidos. — La separación de las fracciones indicadas se realiza mediante cromatografía bidimensional sobre ácido silícico comercial (Silicagel G. Merk). Los sistemas de solventes utilizados son:

I) Cloroformo : metanol : agua en la proporción 72 : 28 : 4,5 v/v. Siguiendo el método de Jaskevit (*Biochem.* Z 1964).

II) Cloroformo : metanol : ácido acético conc. : agua en la proporción 125 : 35 : 0,84 v/v.

En conjunto el procedimiento es una modificación de la metodología propuesta por ROUSER, simplificado y modificado para su utilización en el tipo de muestras a investigar en nuestro laboratorio.

El método separa perfectamente las siguientes fracciones de fosfolípidos: fosfatidil inositol, fosfatidil serina, lecitina, cefalina y esfingomielina. Los derivados plasmalógenos de estos lípidos aparecen con migraciones cromatográficas idénticas a las de los compuestos diacilados. La imposibilidad de determinar los plasmalógenos constituye una de las limitaciones del método.

Determinación de las fracciones fosfolipídicas. — Para la determinación de las fracciones fosfolipídicas separadas se obtiene por simple raspado en gel de sílice conteniendo la mancha cromatográfica y determinación del contenido de fósforo de la misma.

Para la determinación del contenido de fósforo se somete la muestra de digestión en ácido perclórico seguido de análisis del fosfato inorgánico liberado.

Separación de los galactolípidos. — El procedimiento indicado permite la separación de los sulfátidos y los cerebrósidos presentes en los extractos de tejido normales, así como la determinación de aumentos anormales de otros galactolípidos como la ceramida dihexósidos y los ceramida trihexósidos.

La determinación cuantitativa de las distintas fracciones galactolipidicas presenta muchas complicaciones y no se ha conseguido todavía obtener un método lo suficientemente satisfactorio para su aplicación en el trabajo que nos ocupa.

Revelado de las placas cromatográficas. — Para el revelado de las placas cromatográficas se utilizan varios métodos que pueden aplicarse individualmente o combinados.

Procedimiento I: El primer procedimiento consiste en la colocación de la placa en un recipiente conteniendo I_2. Los vapores de I_2 son absorbidos por los lípidos de la placa, permitiendo la visualización de las distintas manchas. Las distintas fracciones pueden ser analizadas para determinar su contenido en fósforo o bien el cromatograma se revela en el procedimiento II.

Procedimiento II: Las placas se pulverizan con el reactivo ácido acético conc.: ácido sulfúrico conc.: p-anisaldehido 100:2:0,4 v/v y se someten a 120° C en estufa durante 15 minutos. Las fracciones fosfolipídicas aparecen de color azul, el colesterol violeta y los galactolípidos de color verde. Las distintas tonalidades del azul permiten distinguir la esfingomielina de resto de los fosfolípidos. Después de esta tinción puede aplicarse el método de determinación cuantitativa de las fracciones fosfolipídicas.

Procedimiento III: Este procedimiento debe aplicarse inicialmente o después del revelado por los vapores de I_2. Consiste en la pulverización de la placa con el reactivo antrona y ácido sulfúrico, calentando en estufa a 120° C durante 10 minutos.

Unicamente se colorean los lípidos conteniendo hexosa en su molécula, lo cual permite identificar perfectamente los sulfátidos y los cerebrósidos, así como la presencia de otras fracciones anormales de galactolípidos.

Cromatografía de los esteres de colesterol. — Los esteres de colesterol representan una fracción muy pequeña de la totalidad del colesterol presente en los tejidos neurales. Existen ciertas condiciones en las que las cantidades de esteres de colesterol aumentan marcadamente. Al parecer en toda condición patológica en la que exista una destrucción de tejido nervioso, y en particular de mielina, los esteres de colesterol se encuentran aumentados. La determinación de esteres de colesterol puede constituir un signo objetivo de alteración destructiva del sistema nervioso.

Por otra parte, varios autores han indicado la presencia en el sistema nervioso inmaduro de cantidades relativas de esteres de colesterol superiores a los hallados en el sistema nervioso adulto. Queda, pues, planteado el problema de si las concentraciones de esteres de colesterol pueden constituir un índice preciso del desarrollo del sistema nervioso.

Procedimiento: El método elegido para la determinación de esteres de colesterol ha sido el siguiente:

Placas de cromatografía en capa fina de Silicagel G.

Solvente: éter de petróleo: dietil éter, 99:1 v/v.

El desarrollo de la cromatografía se realiza a temperatura ambiente y en sentido ascendente. El desarrollo se repite por tres veces para obtener una resolución clara y reproducible.

El procedimiento ha dado buenos resultados, con fracciones de lípidos tisulares obtenidas por cromatografía en columna.

El revelado del cromatograma se consigue por pulverización con ácido fosfomolíbdico en solución etanólica e incubación en estufa a 120° C.

Hasta el momento no se ha resuelto el problema de la determinación cuantitativa.

Determinación de gangliósidos. — El método que se ha adoptado es el siguiente:

Una parte de la fase superior liofilizada se disuelve en cloroformo/metanol (2:1, v/v) con unas gotas de agua, en proporción 20:5 v/v. Se cromatografían por triplicado muestras de 200 lambdas en capa fina de Silicagel G. El solvente empleado es propanol-N/agua (7:2, v/v) y la duración de la cromatografía es de 20 horas.

Una de las placas se revela con reactivo resorcinol diluido a la mitad y las otras dos se exponen a vapores de iodo para visualizar los gangliósidos.

Se señalan las áreas con un objeto de punta fina, se deja sublimar el lodo y se raspan estas áreas depositándolas en tubos de pirex con tapón de rosca. Se toma también un fragmento de la misma placa exento de gangliósidos que se empleará como blanco.

A cada tubo se añade 0,5 ml. de agua destilada, se mezcla y se deja reposar unos minutos. Se les añade luego 0,5 ml. de reactivo resorcinol.

La coloración que se ha producido se extrae con butil acetato/n-butanol (85 : 15, v/v).

La extinción de la fase superior orgánica se lee en un espectrofotómetro a 580 milimicras.

Los gangliósidos que se han valorado con este método son los siguientes: GT_1, GD_{1b}, GD_{1a}, GM_1, GM_2, GM_3 (nomenclatura de Svernnerholm).

Métodos estadísticos: Test de independencia entre dos variables cuantitativas. — *(Coeficiente de correlación* [17]): Se ha aplicado para buscar la relación entre un determinado dato bioquímico y la edad gestacional.

Se ha calculado mediante la fórmula

$$r = \frac{\Sigma(X - m_X)(Y - m_Y)}{\sqrt{\Sigma(X - m_X)^2 \, \Sigma(Y - m_Y)^2}}$$

Siendo Y el dato bioquímico a analizar, X la edad gestacional y m la media correspondiente.

El riesgo correspondiente a r se ha calculado mediante

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

buscándolo en las tablas de t para un número de grados de libertad de n-2. Siendo r el coeficiente de correlación y n el número de casos.

Si α es mayor de 5 %, se considera que las dos variables no están correlacionadas significativamente.

Si α es igual o menor del 5 %, las dos variables están correlacionadas significativamente y α indica el grado de significación.

Test de comparación de dos medias observadas cuando el número de muestras es inferior a 30 [18]. — Se ha aplicado a la comparación entre los datos obtenidos en los distintos lóbulos cerebrales y entre los datos de lóbulos y cerebelo.

La fórmula utilizada es la siguiente:

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}}$$

Siendo m_A la media de un grupo de datos, m_B la media del grupo de datos a comparar, n_A y n_B los respectivos números de casos y s^2 una varianza común a los dos grupos obtenida mediante la fórmula:

$$s^2 = \frac{\Sigma(X - m_A)^2 + \Sigma(X - m_B)^2}{n_A + n_B}$$

Si t en valor absoluto es inferior al valor leído en la tabla de t para un número de grados de libertad de $(n_A + n_{B-2})$ y un riesgo del 5 %, la diferencia no puede considerarse significativa. Si t es igual o mayor a la tabla, la diferencia es significativa y el riesgo indicado en la tabla para el valor de t obtenido por cálculo, fija el grado de significación.

Cálculo de la media y de la desviación standard [19]. — Se han aplicado las fórmulas siguientes:

$$m = \frac{T_1}{n} \quad ; \quad s = \sqrt{\frac{T_2 - T^2_{1/n}}{n - 1}}$$

Siendo m la media, n el número de casos, T_1 la suma de los valores obtenidos, s la desviación standard y T_2 la suma de los cuadrados de los valores obtenidos.

Resultados

Los valores correspondientes a cada muestra se agruparon según la edad de gestación en períodos de dos semanas. Los valores en las tablas y en las gráficas representan la media aritmética del grupo de edad comprendida entre las dos semanas. El grado de dispersión de los valores obtenidos se indica con la desviación standard que ha sido calculada para todos los grupos de número de muestras superior a dos. El valor de la desviación standard se indica en las tablas precedido del signo ± y en las gráficas con un trazo vertical situado sobre el valor correspondiente y de amplitud equivalente en las ordenadas al doble del valor de la misma.

En la figura 1 se muestra el incremento ponderal del sistema nervioso central en el período estudiado. Los valores de la gráfica no incluyen los pesos de médula espinal. El aumento en este período es considerable. El valor correspondiente al final de la gestación es cinco veces superior al valor inicial. Los incrementos absolutos aumentan a lo largo de este período según la edad de gestación de modo que son superiores en la última mitad (entre 30-32 semanas hasta término) que en la primera mitad del período. Lo contrario es cierto si nos referimos al incremento relativo. El valor inicial se multiplica por un factor de cuatro hasta 33-34 semanas y entre este punto y el término de la gestación no llega a duplicarse. Las desviaciones standard oscilan entre un 10 y un 27 por ciento. En la figura 7 se expresa el peso del tejido desecado en relación al % del peso fresco.

Las variaciones de la proporción de lípidos tisulares se muestran en la fig, 2. Las mayores variaciones registradas en este período corresponden a las regiones más bajas del sistema nervioso central. En la médula espinal a las 18-20 semanas de gestación la concentración de material lipídico por gramo de tejido fresco es de 27,10 mg. Al final de la gestación los lípidos tisulares alcanzan los 71,02. El incremento es progresivo durante la totalidad del período, aunque en esta región el aumento registrado en la primera mitad es ligeramente superior que en las últimas diez semanas de gestación.

Un fenómeno parecido se observa en el tronco cerebral aunque de menor intensidad. El valor de lípidos totales al inicio del período (18-20 semanas, tabla I) es de 25,22 mg. por gramo de tejido y alcanzará los 52,96 mg. al término de la gestación, El aumento en la primera parte de la gestación es aquí también ligeramente superior al correspondiente en la segunda mitad.

En la región central de los hemisferios cerebrales, la región denominada núcleos, el aumento de este parámetro bioquímico es también considerable. Los lípidos tisulares pasan de 26,47 mg. a 51,34 mg. En esta región el mayor incremento se observa en la última mitad del período.

En el cerebelo el aumento lipídico tisular ocurre fundamentalmente en las últimas semanas del período estudiado (fig. 2). Desde las 18-20 semanas hasta las 32-34 semanas es prácticamente inexistente (tablas I a, b y c). Las variaciones encontradas en lóbulos cerebrales son similares a las del cerebelo. En la tabla II se muestran los valores correspondientes al lóbulo frontal. Los valores correspondientes a los distintos lóbulos analizados estadísticamente fueron indistinguibles.

Del análisis de la totalidad de los datos obtenidos resulta que en todas las regiones existe una correlación matemática positiva entre las variaciones de la proporción lipídica tisular y la edad de gestación (p/-0,001). No obstante cuando la existencia de correlación fue investigada para el período entre 18-20 semanas y 34-36 semanas sólo fue demostrada para médula espinal, tronco cerebral y núcleos. Entre 34-36 semanas se observa correlación positiva entre concentración lipídica y edad de gestación para cerebelo y lóbulos cerebrales.

La fracción de los fosfolípidos aumenta también en este período en todas las regiones (fig. 4). El aumento demostrado en esta fracción es proporcionalmente inferior al de la fracción lipídica total. En médula espinal el crecimiento de fosfolípidos se dobla durante el período indicado y es superior en la primera mitad. En relación al total lipídico tisular la proporción de fosfolípidos decrece y en las 40-42 semanas representa menos de la mitad en términos molares. La fracción no saponificable (esfingomielina y plasmalógenos) aumenta en términos absolutos y también en relación al total de la fracción fosfolípica (tabla I y fig. 5). En términos absolutos la fracción no saponificable aumenta de 2,6 micromoles por gramo de tejido en las 18-20 semanas hasta 11,7 microgramos al término de la gestación. El incremento es progresivo a lo largo del período y ligeramente mayor en la primera mitad que en la última. El incremento de esta fracción es superior al del total de los fosfolípidos y se traduce en un aumento de los porcentajes (tabla I) que es especialmente marcado en la primera mitad.

Las variaciones de la concentración de fosfolípidos en tronco cerebral son similares a los observados en médula espinal. Los valores de la fracción total aumentan marcadamente (desde 23,54 micromoles/g tejido; (tabla I). En esta región el aumento en la primera mitad del período estudiado es también mayor que el correspondiente a la última mitad. El aumento de la fracción no saponificable es también aquí más marcada (de 2,12 a 7,84) que el de la fracción fosfolípica total, tanto en términos absolutos como en porcentajes del fósforo lipídico total (tabla I y fig. 5) y el incremento es mayor en la primera mitad que en la última.

En el cerebelo la concentración total de fosfolípidos se mantiene estable (alrededor de 23 micromoles/g de tejido) durante gran parte del período estudiado para aumentar en las últimas semanas de gestación (fig. 4). Después aumenta marcadamente hasta alcanzar 33,43 micromoles por gramo de tejido. La fracción no saponificable experimenta un aumento en valores absolutos en la primera mitad del período estudiado, continuando hasta el final de la gestación con incrementos progresivamente mayores (fig. 5).

En la región denominada «núcleos» que comprende la región central de los hemisferios, la concentración de fosfolípidos es superior que en el resto del cerebro. En esta región aumenta también a lo largo del intervalo siendo el aumento en la última mitad del mismo mayor que en la primera.

En lóbulos cerebrales la concentración de fosfolípidos va desde alrededor de 24 micromoles a 34 micromoles por gramo de tejido. El aumento en esta región es también mayor en la segunda mitad del período. La proporción de fracción no saponificable prácticamente no varía, lo cual indica que en términos absolutos de concentración, aumenta al mismo ritmo que la fracción fosfolipídica total.

El colesterol es una fracción lipídica que a las 18-20 semanas se encuentra en magnitud considerable en todas las regiones.Las variaciones registradas en el período estudiado consisten en un aumento que como ocurría con los lípidos totales del tejido es mayor en las regiones bajas y decrece a medida que se asciende en el sistema nervioso central. Sin embargo, los incrementos no son superponibles a aquellos descritos para los lípidos totales.

En médula espinal, el colesterol pasa de 14,24 a 43,06 micromoles por gramo de tejido. Este aumento no es uniforme. Los mayores incrementos se detectan entre las 32-34 semanas y la edad correspondiente al término de la gestación. La proporcion de colesterol en el total de la fracción lipídica tisular se mantine pero la relación entre las distintas fracciones cambia debido a la disminución relativa de la fracción fosfolipídica.

En el tronco cerebral, el aumento de colesterol tisular es mucho menor. El valor inicial es de 10,12 microgramos y alcanza 29,03 microgramos por gramo de tejido a las 40-42 semanas de edad de gestación y el incremento es prácticamente uniforme.

En cerebelo, núcleos y lóbulos cerebrales el aumento de colesterol no es detectable hasta la última mitad (tabla I) del período estudiado y se localiza en las últimas semanas del mismo (fig. 6).

Las variaciones de la concentración de galactolípidos constituyen uno de los cambios más importantes de la composición química tisular durante la

maduración del sistema nervioso. En médula espinal a las 18-20 semanas se detecta ya una cantidad considerable de galactolípidos (3,44 micromoles por gramo de tejido). La concentración aumenta de modo progresivo y prácticamente uniforme hasta 9,66 micromoles a la edad correspondiente al final de la gestación. El incremento de esta fracción en tronco cerebral es perfectamente paralelo al observado en médula espinal pero partiendo de 2,19 micromoles al inicio del período alcanza 6,49 micromoles por gramo de tejido en el intervalo de 40-42 semanas de gestación.

En cerebelo, la proporción de galactolípidos se mantine constante hasta las últimas semanas de la gestación observándose un aumento que comienza entre las 36-38 semanas prosiguiendo en las semanas siguientes.

En las regiones cerebrales la proporción de galactolípidos se mantiene constante durante las primeras semanas a partir del inicio del período para aumentar en la región central del hemisferio cerebral (núcleos) a partir de las 36-38 semanas de gestación. En las regiones denominadas lóbulos cerebrales la concentración de galactolípidos se mantiene en los mismos niveles durante todo el período objeto de nuestro estudio.

Los sulfatidos, varían paralelamente a la fracción galactolipídica total, de modo que en términos molares representan entre un tercio y un quinto del total de la fracción galactolipídica. La proporción de sulfatidos en la fracción galactolipídica aumenta según el volumen total de la fracción y la región a que corresponda. Así en los lóbulos cerebrales la proporción de sulfatidos es baja y se mantiene baja durante todo el período estudiado mientras que en regiones topográficas inferiores (médula espinal y tronco) los sulfatidos alcanzan un tercio de la fracción global.

Los proteolípidos, fracción proteica que en estado nativo se encuentran asociados con los lípidos, presentan también variaciones importantes de concentración entre 18-20 y 40-42 semanas. En la médula espinal aumentan desde 2,37 mg. a 4,92 mg. por gramo de tejido, siendo el incremento mucho más marcado en la primera mitad del período que en la última. En tronco cerebral, el aumento de proteolípidos es de magnitud similar pero ocurre principalmente entre las 32-34 semanas y la edad correspondiente al término de la gestación. En cerebelo el aumento es menos marcado y ocurre en las últimas semanas de gestación.

En los lóbulos cerebrales los proteolípidos aumentan progresivamente pero en pequeña magnitud alcanzando al final del período 1,54 mg. por gramo de tejido. En núcleos la concentración es mayor alcanzando 2,54 mg. por gramo.

Resultados gangliósidos

Los valores totales de glangliósidos expresados en microgramos de NANA por gramo de tejido fresco, muestran una elevación progresiva a lo largo del período en todas las regiones analizadas. En lóbulos cerebrales el aumento no es uniforme, sino que se acentúa mucho más marcadamente a partir de las 30-32 semanas de gestación, de forma que a las 40-44 semanas prácticamente se han duplicado las cifras halladas para las 22-24 semanas (fig. 8 y

tabla III). Mediante el tratamiento estadístico de los datos obtenidos se han puesto de manifiesto los siguientes hechos.

Hay correlación positiva con un riesgo α de error inferior a 0,01 entre las cifras de NANA total halladas en lóbulo frontal y la edad gestacional. Hay correlación positiva con un riesgo α de error inferior a 0,01 entre las cifras de NANA total halladas en lóbulo temporal y la edad gestacional. Hay correlación positiva con un riesgo α de error inferior a 0,01 entre las cifras de NANA total halladas en lóbulo occipital y la edad gestacional. No puede afirmarse con los datos obtenidos que las cifras de NANA total estén correlacionadas con la edad gestacional en el caso del cerebelo. Comparando los datos obtenidos en los períodos comprendidos entre 26-30 semanas, 32-36 semanas y 38-42 semanas para los distintos lóbulos cerebrales (frontal, occipital y temporal) no encontramos diferencia significativa entre ellos para ninguno de los períodos estudiados (tablas II a, b y c). Somparando los datos obtenidos en lóbulo frontal con los obtenidos en cerebelo no se encuentra diferencia significativa para los períodos 26-30 semanas y 38-42 semanas; sin embargo, encontramos que la diferencia es significativa con un riesgo α de error inferior a 0,02 en el período 38-42 semanas.

La distribución de los distintos glangliósidos obtenida en lóbulo frontal presenta las siguientes características (tabla IV y fig. 9):

El ganglióside mayoritario es GD_1a representando en proporción molar un 40 % del total. Mediante el cálculo estadístico no se ha podido poner de manifiesto ningún tipo de correlación de las cifras de GD_1a en proporción molar relativa al total con la edad gestacional. Cuantitativamente en proporción molar respecto al total de las fracciones le siguen GM_1 con un 33 % y GD_1b con un 16 %. Tampoco se ha podido poner de manifiesto ninguna correlación entre las cifras de GM_1 y GM_1b en % molar con la edad de gestación. El ganglióside GT_1 es el minoritario, encontrándose en una proporción molar aproximadamente del 13 % del total; las cifras de GT_1 en % molar presentan correlación negativa con la edad gestacional con un riesgo alfa de error inferior a 0,01, es decir que disminuyen cuando la edad aumenta.

La distribución de los distintos gangliósidos encontrada para el lóbulo occipital presenta las mismas características que la encontrada por el lóbulo frontal (fig. 11 y tabla V). Se han comparado los datos obtenidos en lóbulo occipital con los obtenidos en lóbulo frontal en los períodos comprendidos entre las 26-30, 32-36 y 38-42 semanas de gestación (tablas II a, b y c) y no se ha encontrado ninguna diferencia significativa entre los dos lóbulos.

La distribución de los distintos gangliósidos obtenida para el lóbulo temporal presenta también idénticas características que la obtenida para los lóbulos frontal y occipital y tampoco se ha encontrado diferencia significativa con los citados (fig. 10 y tabla VI).

La distribución gangliosídica encontrada en el cerebelo presenta las siguientes características (fig. 12 y tabla VII). El trisialoganglióside (GT_1) representa en proporción molar un 17 % respecto al total de las fracciones aproximadamente, no habiéndose encontrado correlación entre las cifras GT_1 expresadas en % molar y la edad gestacional. La proporción molar respecto al total de GT_1 es mayor que en lóbulos cerebrales en todas las edades de

gestación, el riesgo alfa de error encontrado en las comparaciones en inferior a 0,05 para las 26-32 semanas, inferior a 0,001 para las 32-36 semanas, e inferior a 0,01 para las 38-42 semanas. El ganglíosido GD_1b se encuentra en una proporción molar relativa de un 20 % siendo también más elevada que la que presenta en lóbulos cerebrales. No se ha encontrado correlación entre las cifras de GD_1b expresadas en % molar y la edad de gestación. La proporción molar de GD_1b relativa al total de las fracciones gangliósidas es más elevada que la hallada en lóbulos cerebrales en todas las edades de gestación, siendo el riesgo alfa de error inferior a 0,01 para las 26-30 semanas, inferior a 0,02 para las 31-36 semanas e inferior a 0,01 para las 38-42 semanasnas. El ganglíosido GD_1a se encuentra en una proporción molar aproximadamente del 28 % del total de las fracciones. No se ha encontrado correlación entre las cifras de GD_1a en % molar y la edad de gestacicón. Las cifras de GD_1a en % molar son inferiores a las obtenidas en lóbulos cerebrales en todas las edades de gestación, siendo el riesgo alfa de error inferior a 0,05 para las 26-30 semanas, inferior a 0,05 para las 32-36 semanas e inferior a 0,01 para las 38-42 semanas. El ganglíosido GM_1 se encuentra en la proporción molar de un 35 % respecto al total de las fracciones gangliosídicas. No se ha encontrado correlación entre las cifras de GM_1 en % molar y la edad de gestación. No se ha encontrado diferencia significativa entre las cifras de GM_1 en % molar en cerebelo y las de GM_1 en % molar en lIóulos cerebrales para ninguna edad de gestación.

Discusión

En términos generales el sistema nervioso central se desarrolla de modo similar en las distintas especias desde el período embrionario a través de los períodos fetales, neonatales, etc., hasta el adulto. Existen marcadas diferencias de especie, en forma de desproporciones regionales, como por ejemplo el mayor tamaño del cerebro en los primates que se acompaña de un aumento de la complejidad morfológica, pero la secuencia de los fenómenos madurativos es fundamentalmente la misma en las distintas especies de mamíferos. Una de las diferencias más aparentes la constituye la localización del final de la gestación e inicio de la vida extrauterina en el proceso progresivo de la maduración nerviosa.

En el humano como se indica en la figura 1, *el crecimiento del encéfalo* ocurre en magnitud considerable en la segunda mitad de la vida prenatal. El incremento es creciente al aproximarse al término de la gestación coincidiendo nuestros resultados con las conclusiones de Dobbing [20] que indica la existencia de un brote de crecimiento con un punto máximo que coincide aproximadamente con el final de la gestación. (En la rata el punto máximo de crecimiento del encéfalo se encuentra en el día diez de la vida postnatal, mientras que en el cobaya ocurre en un período anterior al término de la gestación).

La *concentración lipídica* del tejido nervioso en las fases iniciales del desarrollo es similar a la de los otros órganos de la economía que se cifra, a excepción del tejido adiposo, en un 4 % del peso fresco. Es durante el

desarrollo de este tejido cuando se observa una síntesis rápida de material lipídico que es característica del sistema nervioso y lo diferencia claramente de otros tejidos. El aumento de la concentración de las diversas fracciones lipídicas deberá considerarse en superposición a la curva mostrada de pesos globales cuyos incrementos ya hemos subrayado. Es decir, la magnitud de la biosíntesis de material lipídico en este período debe considerarse como producto aritmético del incremento del tamaño de órgano o tejido y del incremento de la concentración de este material y que expresamos habitualmente como miligramos o micromoles de la fracción determinada por gramo de tejido fresco.

Ha habido considerable polémica con respecto al modo le expresar los datos referentes a la composición química de un tejido en general y especialmente del tejido nervioso [21]. Estos son expresados por distintos autores como relativos al peso seco del tejido o referidos al peso global en fresco. Cuando se trata de una fracción lipídica individual, algunos autores prefieren la expresión en tanto por ciento del material lipídico total. Menos frecuentemente se han presentado como porcentajes de las concentraciones finales obtenidas del tejido adulto. Nosotros hemos preferido referir todos los datos al gramo de tejido fresco, lo cual creemos expresa más fielmente la situación del tejido, siendo además un valor sinónimo al de concentración química. La fracción fosfolipídica no saponificable se ha expresado excepcionalmente como porcentaje del valor global de los fosfolípidos tisulares reflejando así la metodología utilizada para su determinación. Para las fracciones lipídicas individuales los resultados se presentan como mg y micromoles por gramo de tejido. Esta última expresión la consideramos especialmente apropiada, ya que sugiere la composición molecular de las nuevas estructuras formadas. Esto es especialmente indicativo en este caso, ya que la proporción molecular de los componentes lipídicos de la mielina es conocida, y la mielinización es uno de los procesos madurativos englobados en el presente estudio.

Las diversas fracciones lipídicas estudiadas globalmente como lípidos totales y consideradas a lo largo del período ya permiten observar una secuencia de fenómenos que por sus características de progresión y por su distinto tiempo de aparición en los diferentes órganos que constituyen en S.N.C. representan un criterio bioquímico de la maduración tisular. En efecto, en la gráfica de la figura 2, en la que se recogen en forma de curva los valores promedios de lípidos totales en los distintos órganos o regiones referidas a la edad de gestación, se observan modelos de maduración que coinciden en la secuencia de progresión a lo largo del sistema completo con los módulos establecidos por los histólogos como secuencias de mielinización.

Es probable, como veremos más adelante, que las variaciones de concentración lipídica global tengan una significación más amplia que la correspondiente a la propia mielinización. El importante acúmulo tisular lipídico que representa la formación de la mielina pueda enmascarar cambios que, aunque de menor magnitud, puedan tener gran significación funcional. Por este motivo se han estudiado otras fracciones lipídicas que por estar fundamentalmente localizadas en mielina permitan distinguir la mielinización propiamente dicha de otros posibles procesos madurativos que impliquen también variaciones en la distribución tisular de los lípidos.

CEREBRÓSIDOS. — La acumulación de *cerebrósidos* constituye un índice reconocido de la progresión de la mielinización mejor que la acumulación del material lipídico global o de cualquiera de las demás fracciones lipídicas individuales. En efecto, los cerebrósidos se encuentran casi exclusivamente en la membrana mielínica. WELLS y DITTMER en sus estudios sobre la mielinización de la rata sitúan a los galactolípidos en el grupo de los lípidos asociados primariamente con la mielinización [22]. En este animal aparecen en el encéfalo entre el día seis y el día doce y aumentan rápidamente hasta los 180 días, a partir de los cuales el aumento continúa muy lentamente. La aparición y acumulación de estos compuestos coincide con el fenómeno morfológico de la mielinización. Además, los estudios sobre mielina aislada indican que los galactolípidos representan en términos molares un quinto de los compuestos lipídicos de esta estructura. Aunque estudios recientes indican la presencia de este grupo lipídico en neuronas aisladas, su concentración en este tipo celular es tan baja con respecto a las concentraciones mielínicas que su influencia en las grandes variaciones del valor global de galactolípidos tisulares es negligible.

Las variaciones de la concentración de *galactolípidos* en las distintas regiones constituyen uno de los fenómenos de mayor significación. En médula espinal, en las 18-20 semanas la concentración de galactolípidos es ya mayor que en el resto de las regiones del sistema nervioso central (tabla I) y representa más de un 7 % del material lipídico del tejido. A diferencia de otras fracciones lipídicas el aumento es uniforme, siendo los incrementos similares en las dos mitades del período objeto de nuestro trabajo. El crecimiento es también uniforme al valorar esta fracción como tanto por ciento del total lipídico tisular. Al final de la gestación los galactolípidos alcanzan el 9,48 % de los lípidos totales del tejido.

La comparación entre las variaciones de los galactolípidos en las distintas regiones estudiadas (fig. 3) y de éstas con las curvas obtenidas para los lípidos totales permite distinguir ciertos parámetros de desarrollo indicativos como criterios bioquímicos de maduración. Los aumentos de concentración de los galactolípidos muestran una correlación positiva con la edad de gestación en médula espinal ($p < 0{,}01$), tronco cerebral ($p < 0{,}01$), cerebelo ($p < 0{,}05$), porción central del hemisferio cerebral ($p < 0{,}02$) y lóbulo occipital ($p < 0{,}05$). En el resto de los lóbulos cerebrales no existe correlación demostrable estadísticamente entre la variación de la concentración de galactolípidos y la edad gestacional. Cuando el estudio estadístico se limitó al período entre 18-20 semanas y 32-34 semanas no se obtuvo correlación ($p > 0{,}05$) entre las variaciones de la concentración de galactolípidos y edad de gestación para los lóbulos cerebrales, porción central de los hemisferios ni cerebelo.

Estos resultados son indicativos de que para estas últimas regiones la mielinización química no comienza hasta las 32-34 semanas de gestación, mientras que en el tronco cerebral se está iniciando precisamente al comienzo del período estudiado (18-20 semanas) cuando en la médula espinal se detecta ya un grado apreciable de mielinización.

El valor regional más bajo de galactolípidos correspondiente al intervalo 18-20 semanas corresponde a los lóbulos cerebrales. En esta región los galactolípidos representan en términos molares un porcentaje superior al 3 %. Creemos que con la metodología empleada (método del orcinol) los valores obtenidos son superiores a los correspondientes a la verdadera composición del tejido. El estudio cromatográfico de las muestras conteniendo valores de galactolípidos inferiores al cinco por ciento obtenidos por el método indicado, demostró que las fracciones correspondientes a los cerebrósidos son indetectables por los métodos habituales de revelado. Así por ejemplo la presencia de cerebrósidos es perfectamente detectable en una muestra del extracto total lipídico conteniendo 250 microgramos de lípidos procedentes de un cerebelo correspondiente a las 32-34 semanas, mientras que es indetectable en una muestra análoga correspondiente al lóbulo frontal del mismo período.

A partir de las 32-34 semanas la concentración de galactolípidos es superior en la región central del hemisferio que en los lóbulos cerebrales. Es probable que a este nivel se detecte la mielinización de los tractos que transcurren por los pedúnculos cerebrales y alcanzan las áreas peritalámicas. La existencia de un incremento lipídico total que es también superior en esta región que en los lóbulos apoyaría la citada hipótesis.

Fosfolípidos. — Los *fosfolípidos* considerados globalmente aumentan durante la maduración según un modelo que difiere del descrito para los lípidos totales o para los galactolípidos. Hemos descrito que en las fracciones de mayor incremento lipídico, la médula espinal y el tronco cerebral donde puede considerarse que éste es más completo, el aumento es progresivo y uniformemente repartido desde las 18-20 semanas hasta el final de la gestación. En las mismas regiones y en el mismo período el aumento de fosfolípidos es superior en la primera que en la última mitad del período estudiado. El enriquecimiento lipídico tisular es al inicio proporcionalmente mayor en fosfolípidos que en otros grupos de lípidos. Podría, pues, concluirse que en la porción inicial de las curvas del aumento lipídico total estaría constituido en su mayor parte por el aumento de fosfolípidos, mientras que en períodos más tardíos el aumento predominante sería de otras fracciones lipídicas.

Al considerar las cifras de fosfolípidos en cerebelo se observa que el incremento no ocurre hasta las últimas semanas de gestación. El aumento de fosfolípidos coincide también en esta región inicial de incremento lipídico y el incremento de galactolípidos. En «núcleos», la región central del hemisferio cerebral el aumento de concentración de fosfolípidos es paulatino y el mayor aumento registrado coincide con las últimas semanas de la gestación y con enriquecimiento tisular de galactolípidos. El modelo de acumulación de fosfolípidos no es, pues, necesariamente distinto en las distintas regiones a pesar de lo observado en estas últimas. La contradicción aparente podría explicarse por la distinta localización en el tiempo de la mielinización.

Las observaciones de otros autores en cerebro humano y en encéfalo de rata coincidiendo en la conclusión de un crecimiento asimétrico del total de los fosfolípidos tisulares registrado en forma de disminución progresiva de la proporción de estos lípidos dentro de los lípidos totales del tejido. Norton y Poduslo obtienen una disminución que va desde el 76,1 % a los 10 días

hasta el 55,9 % a los 144 días. Esto confirma nuestra hipótesis anunciada en el párrafo anterior, conforme a la cual el enriquecimiento tisular de fosfolípidos durante la maduración ocurre en las fases primeras de la misma a diferencia de los lípidos globales del tejido que presentan un aumento más uniforme.

Las variaciones de la *fracción fosfolipídica no saponificable* (constituida por la esfingomielina y los plasmalógenos) son tan marcadas como las observadas con los galactolípidos. En las 18-20 semanas en la mayoría de las regiones representa entre un nuevo y un diez por ciento del total de los fosfolípidos. En términos absolutos de concentración resultan alrededor de 2,2 micromoles por gramo de tejido. El valor más alto lo alcanza al final de la gestación en médula espinal con una concentración de 11,78 micromoles por gramo de tejido, siendo un 24 por ciento de la fracción fosfolipídica global. Las cifras obtenidas al inicio del período en todas las regiones corresponden con las publicadas por WELLS y DITTMER en el encéfalo de la rata a los tres días cuando la mielinización no ha comenzado y la fracción mayoritaria no saponificable está constituida por el plasmalógeno de etanolamina.

El aumento de la fracción fosfolipídica no saponificable es reflejo de la mielinización en progreso. En efecto, la mielina aislada contiene un alto porcentaje de fracción no saponificable que a partir de los datos que constan en la literatura [23] hemos calculado es de 32,94, 35,45 y 40,53 en porcentajes de los fosfolípidos totales en edades crecientes. Cuando la proporción de fosfolípidos no saponificables se ha calculado en un órgano global como en el encéfalo de la rata, el aumento de esta fracción coincide perfectamente con los períodos histolóicos de mielinización. A los 10 días la fracción constituida por los plasmalógenos y la esfingomielina representa el 15,6 por ciento, aumentando progresivamente de modo que en el día 60 de la vida extrauterina la proporción alcanza el 26 por ciento de los fosfolípidos totales.

Al comparar los incrementos de la fracción no saponificable en las distintas regiones se observa la existencia de modelos de crecimiento aparentemente diferentes que permiten distinguir dos tipos de maduración. En el primero se incluyen los correspondientes a la médula espinal y al tronco cerebral, donde los incrementos en la primera mitad del período son superiores a los registrados en la segunda mital, pero de magnitud comparable. El segundo tipo es el que se observa en cerebelo y en las regiones cerebrales donde el crecimiento en la segunda mitad es muy superior al de la primera.

Es probable que las diferencias observadas en el modelo de crecimiento a diferencias regionales en el tiempo de aparición de un mismo proceso que a la existencia de procesos distintos. Podría, pues, concluirse atendiendo a la significación biológica del aumento de concentración de fracción fosfolipídica no saponificable citada en el párrafo anterior que entre las 18-20 semanas y el término de la gestación la mielinización en médula espinal y en tronco cerebral alcanza el período de máxima actividad y comienza a decrecer, mientras que en el resto de las regiones estudiadas este proceso ocurre más tardíamente, de modo que iniciándose antes de finalizar la gestación, al final de la misma la biosíntesis de la membrana mielínica está todavía en actividad creciente.

COLESTEROL. — El *colesterol* es también componente principal de la membrana mielínica. En términos molares representa alrededor de dos quintas partes de su material lipídico [24] y se mantiene constante en distintos períodos de la mielinización en valores que representan entre 25 y 27 por ciento de los componentes lipídicos. Sin embargo, su presencia en otras membranas en cantidades considerables hace que las variaciones de su concentración global puedan difícilmente considerarse como específicas. No obstante, con la maduración la concentración de colesterol en tejido nervioso aumenta ocupando una parte progresivamente mayor en el total lipídico del tejido.

A las 18-20 semanas la concentración de colesterol es diferente en las distintas regiones. Asumiendo que lo mismo tronco cerebral, cerebelo y las regiones cerebrales se encuentran en un estadio en el que la mielinización no ha comenzado o que es insignificante tal como sugieren las cifras de galactolípidos, podemos concluir que las cantidades de colesterol en las regiones cerebrales son marcadamente mayores que las que se encuentran en cerebelo y tronco cerebral. Las bajas concentraciones de colesterol en cerebelo se mantienen a lo largo del desarrollo a pesar de los cambios sufridos durante la mielinización.

En médula espinal donde se han registrado las máximas variaciones en las fracciones lipídicas, el colesterol aumenta desde 14,24 hasta 43,06 micromoles por ciento del total lipídico del tejido. Esto indica que el colesterol no sólo aumenta en términos absolutos de concentración en el tejido, sino que la fracción lipídica sufre un progresivo enriquecimiento en colesterol. Lo mismo el aumento de concentración que el incremento relativo al resto del material lipídico ocurre a lo largo de todo el período, pero predominantemente en la segunda mitad. En el tronco cerebral el fenómeno es similar al ocurrido en médula espinal, pero de menor magnitud sugiriendo una secuencia de fenómenos idénticos, pero retrasados con respecto a esta última región.

Comparando los resultados obtenidos en cerebelo, núcleos y lóbulos cerebrales se observa que en las tres regiones los aumentos registrados entre 18-20 semanas y las 32-34 semanas (tabla I) las variaciones de concentración de colesterol son prácticamente inexistentes, de modo que las cifras correspondientes a núcleos y lóbulos cerebrales son siempre mucho mayores que las correspondientes a cerebelo. A partir de las 34 semanas el aumento de concentración ocurre en la región denominada «núcleos» coincidiendo con un valor también elevado de galactolípidos. En cerebelo donde el aumento de colesterol es muy marcado, coincidiendo también con el aumento de galactolípidos, la proporción de colesterol tan sólo es de un 32 por ciento comparado con el 35,5 por ciento en los lóbulos cerebrales donde la mielinización, a juzgar por la cifra de galactolípidos, se encuentra mucho menos avanzada.

PROTEOLÍPIDOS. — El *proteolípido de Folch* [26] es claramente uno de los componentes principales del contenido proteico de la mielina [26]. Su progresivo incremento en el tejido nervioso ha sido ampliamente demostrado, así como la relación entre el número de evoluciones de la espiral mielínica y su concentración en sustancia blanca [27]. En principio puede, pues, aceptarse que su concentración es fiel reflejo de la mielinización.

Al comparar las variaciones de proteolípidos con las de los galactolípidos se aprecia que los incrementos en el período estudiado no siguen los mismos modelos. En primer lugar, la magnitud de los mismos son distintos. En la médula espinal, donde todos los parámetros nos han indicado una mielinización progresiva que comprende todo el período, el aumento de concentración es de 2,55 mg. por gramo de tejido. Al final de la gestación la concentración de proteolípidos es algo más que el doble del valor de las 18-20 semanas. En miligramos, la relación entre los aumentos de galactolípidos y proteolípidos es de 2,4 en esta región, que es aproximadamente la relación que existe entre estas dos sustancias en la mielina aislada [26]. Hay, pues, un acuerdo entre el grado de mielinización expresado por los valores de galactolípidos y el representado por la concentración de proteolípidos. Sin embargo, cuando estudiamos el proceso longitudinalmente a lo largo de todo el período, los crecimientos no son paralelos ni similares.

Entre las 18-20 semanas y las 32-34, el aumento de proteolípidos es de 2,15 mg., mientras que el de galactolípidos es de 2,56. La relación aquí es mucho menor que la que resulta de la comparación de los valores globales. El modelo de incremento mostrado por los proteolípidos es, pues, distinto al de los galactolípidos.

El fenómeno descrito no ocurre ni en tronco cerebral ni en el resto de las regiones estudiadas. En tronco cerebral el incremento de proteolípidos es mayor en el último período; por el contrario, los galactolípidos tienen un crecimiento más uniforme. En cerebelo el incremento es a partir de las 34 semanas y es mayor para los proteolípidos

Las variaciones de proteolípidos podrían explicarse razonando de modo similar al seguido para explicar los incrementos observados para los fosfolípidos. Los proteolípidos se acumularían en las distintas regiones siguiendo un modelo parecido de significación idéntica. Las divergencias observadas en el período estudiado se deberían al distinto tiempo de aparición de un mismo fenómeno. El orden de aparición sería: médula espinal, tronco cerebral, cerebelo, núcleos y lóbulos cerebrales.

Este orden coincide con la secuencia de mielinización.

La divergencia observada entre el incremento de proteolípidos y el incremento en galactolípidos es de interpretación más difícil. Otros autores, por análisis de estas dos sustancias en distintas localizaciones del sistema nervioso, habían señalado la falta de correlación entre las concentraciones de proteolípidos y galactolípidos [28]. La conclusión sería, por tanto, que o bien se encuentran en estructuras distintas o se encuentran en una misma estructura morfológica, pero de composición química cambiante. Recientemente Norton y Podsulo han mostrado que la composición química de la mielina presenta unas ciertas variaciones con la maduración. Así en la rata los galactolípidos representan el 20-22 por ciento del total lipídico de la mielina aislada en el día 15, alcanzando el 30 por ciento en el día 60. De modo que el aumento de galactolípidos indica a la vez el aumento de la cantidad de mielina por gramo de tejido y la maduración de la propia estructura. Es, pues, explicable el que cuando el incremento de la concentración de proteolípidos comienza a disminuir, el incremento de los galactolípidos se manten-

ga. Esto a condición de que la proporción de proteolípidos en la mielina no aumente como ocurre con los galactolípidos.

GANGLIÓSIDOS. — Los *gangliósidos* han sido relacionados, según trabajos de distintos autores, con el fenómeno de la transmisión nerviosa (WOOLLEY, 1964; MC ILWAIN); desde los primeros experimentos de subfraccionamiento celular de cerebro (WOLF y EICHBERG y cols., 1964), se vio que se localizaban preferentemente en las fracciones conteniendo sinaptosomas. Posteriormente se obsrevó que durante la ontogénesis del sistema nervioso central los gangliósidos no mantienen siempre la misma proporción relativa entre ellos, aumentado además de una forma muy marcada la concentración, lo cual, si se tiene en cuenta el paralelo aumento de peso de órgano, significa un aumento de síntesis extraordinario [29, 30].

Este hecho, que ha sido bien estudiado en la rata en los primeros días de vida extrauterina (MERAT y DICKERSON, 1973; BASS, 1971; VANIER y col., 1971), se ha visto mediante observaciones histológicas, que coincide con el proceso de proliferación, diferenciación neuronal y formación de sinapsis, siendo, pues, en cierta forma un índice de sinaptogénesis [31, 32, 33].

En el ser humano el proceso correspondiente tiene lugar ya antes del nacimiento; ha sido poco estudiado bioquímicamente (SVENNERHOLM, 1963; SVENNERHOLM, 1964; HOODGWINKEL, 1969; VANIER y col., 1971) y con escaso número de muestras [33, 34, 35, 36].

Nuestros resultados ponen de manifiesto el hecho de que el aumento de concentración no es uniforme, sino que hay un período de crecimiento lento entre las 20 y las 30-32 semanas de gestación y un aumento más marcado desde las 32 semanas hasta las 40-42 semanas de vida fetal. Este hecho se da en los tres lóbulos estudiados (frontal, occipital y temporal). El primer período de incremento moderado corresponde a la etapa de multiplicación de neuronas y células gliales, y el segundo período de crecimiento rápido de la concentración correspondería a la etapa que va aproximadamente de las 25 semanas de vida fetal hasta término y que se caracteriza, según MC ILWAIN, por la multiplicación de células gliales y microneuronas, formación de dendritas y axones y establecimiento de conexiones neuronales [37].

En lo que respecta a cerebelo, no existen datos comparativos de otros autores, pero encontramos una curva mucho más aplanada, con unos valores muy ligeramente inferiores a lóbulos cerebrales, pero sin que haya diferencia significativa entre ellos hasta las 30-34 semanas de gestación; en cambio, desde esta edad hasta término, la diferencia es significativa, llegando los valores de la concentración NANA en lóbulos a duplicar a los de cerebelo. El hecho de que en cerebelo se presenten valores más bajos y con una pendiente de la curva menos pronunciada, coincide con lo observado en la rata y el cerdo por MERAT y DICKERSON (1973) [31].

Respecto al fraccionamiento de los distintos gangliósidos en la etapa de vida fetal, los únicos datos cuantitativos en cerebro son los de HOOGHWINKEL (1969) y VANIER y col. (1971) que emplean metodologías distintas y el número de muestras estudiado es pequeño, 4 y 7 respectivamente. Los resultados coinciden en el aumento de las cifras de GD_1 a en % molar respecto al total

de las fracciones durante el período estudiado y el descenso de las cifras de GT_1, pero no dan los mismos porcentajes molares para las distintas fracciones gangliosídicas [33, 36].

Resumiendo los datos aportados por VANIER y col., que son los más recientes, vemos que en cerebro y para el período correspondiente al estudiado por nosotros, existe un ascenso de GD_1a, el ganglósido mayoritario, que va del 32 % al 50 % en proporción molar relativa respecto al total de las fracciones, con un ligero descenso a término; para GM_1 expresado en las mismas unidades un ascenso del 28 % al 38 %; para GT_1 en proporción molar, un descenso del 20 % al 12 %, y para el % molar de Gd_1b, un descenso del 10 % al 7 %.

Nuestros datos, obtenidos con 23 muestras de lóbulo frontal y expresados en las mismas unidades, muestran un aumento de GD_1a del 38 al 48 %; para GM_1, un aumento del 28 % al 30 %; para GT_1, un descenso del 18 % al 12 %, y para GD_1b, un descenso del 20 % al 15 %.

El número de muestras estudiado nos ha permitido analizar estadísticamente los datos, y hemos encontrado que la edad de gestación y el descenso del % molar relativo GT_1 están correlacionados con un riesgo alfa de error inferior a 0,01. Respecto al descenso de GD_1b, no podemos afirmar con un riesgo alfa de error matemáticamente aceptable (es decir, inferior a 0,05) que esté correlacionado con la edad fetal, debido a que eran demasiado acusadas las variaciones individuales para cada edad. Lo mismo podemos decir del ascenso de los % molares de GM_1 y GD_1a, lo cual no descarta que la correlación exista, máximo teniendo en cuenta que la hay en el descenso de GT_1.

Sin embargo, debemos considerar que la desviación standard del método, reducible mediante mejoras en las técnicas, viene sumada a la variación individual entre cada muestra, que es considerable, y que la potencia y aplicabilidad del test estadístico depende de que se cumplan las condiciones de que la distribución de y para una x dada es normal y de varianza constante, cualquiera que sea x, lo cual significa en nuestro caso que para cada edad de gestación el dato bioquímico a analizar debe presentar una distribución normal y con una varianza que sea siempre la misma para el grupo de datos correspondiente a cada edad de gestación. La condición de normalidad no puede demostrarse siempre aplicando fórmulas matemáticas debido a límites impuestos por la cifra del número de casos; en cuanto a la comprobación de la igualdad de varianzas, puede hacerse, por ejemplo, comprobando grupos de dos en dos mediante el test de $F = sA^2/sB^2$ [38]; sin embargo, dado el carácter de los datos estudiados, hemos estimado lícito admitir que se encuentran en la naturaleza siguiendo distribuciones normales y de la misma varianza.

Los datos que hemos encontrado en lóbulo frontal vienen corroborados por los hallados en lóbulo temporal y lóbulo occipital, puesto que se corresponden exactamente. No habiendo podido poner de manifiesto diferencias significativas entre lóbulos mediante el análisis estadístico de los datos. Las condiciones de validez exigidas para los métodos empleados son las mismas que para el cálculo de los coeficientes de correlación, es decir, normalidad

de distribución e igualdad de varianzas que asumimos se cumple en nuestro caso. En algunos casos de comparación de medidas podía haberse aplicado el método de análisis de la varianza para simplificar las comparaciones, pero se ha evitado por razones de programación de la calculadora, teniendo en cuenta que en este caso el método elegido no afectaba a las conclusiones.

La comparación con los datos de VANIER y col. es difícil porque separan córtex de materia blanca, y en nuestro caso se ha hecho un homogeneizado de todo el lóbulo por estimar que en los puntos de edad de gestación baja con escasa mielinización la disección ofrecía pocas garantías de precisión. Los datos que hemos citado anteriormente correspondientes a dicho autor, procedían de córtex, y probablemente es debido a esta razón que da valores de GD_1a más altos, ya que en materia blanca la proporción molar de GD_1a es bastante inferior; no descartamos, sin embargo, que este argumento no explique por completo el hecho en las edades en que precisamente haya un escaso índice de mielinización.

Las cifras de GM_1 en % molar encontradas por nosotros son ligeramente inferiores hacia el final del período estudiado; sin embargo, hemos descartado el atribuirlo a pérdidas debido al proceso de extracción por las siguientes razones: al recoger la fase superior se desprecian dos lavados; podría objetarse que con ello se pierde el material que puede ser extraído con los mismos. Se ha comprobado que dichos lavados contienen, expresándolo en NANA, un 1,7 % del NANA total. Mediante la técnica de fraccionamiento en capa fina, citada en el apartado material y métodos, se ha investigado si la pérdida afectaría por igual a los distintos gangliósidos, viéndose que GD_1b y GM_1 son los más afectados; sin embargo, como en conjunto sólo se pierde un 1,7 % del total, se decidió prescindir de los lavados. El conservarlos y reunirlos con la fase superior hubiese supuesto manejar grandes volúmenes de líquido, obligando a liofilizar en recipientes grandes, y como el material a estudiar se halla muy poco concentrado, hubiesen sido considerables las pérdidas al recogerlo de una superficie demasiado extensa. Por lo tanto, no era aconsejable modificarlo en este sentido.

La distribución característica de gangliósidos en cerebelo difiere claramente de la hallada en cerebro, hasta el punto de que se habla de un «pattern cerebelar». Los primeros datos que pusieron de manifiesto estas diferencias son los de SUZUKI [39], que da para el adulto las siguientes cifras expresadas en % molar relativo al total de las fracciones:

	Cerebro		Cerebelo	
% molar	44 años	73 años	44 años	73 años
GT_1	19,5	22,1	32,6	37,7
GD_1b	27,3	26,5	30,6	28,5
GD_1a	30,9	24,2	18,5	15,9
GM_1	22,4	27,2	18,3	17,9

Vemos, pues, que hay un aumento del % molar de GT_1 y una disminución de la fracción GD_1a.

En cerebelo fetal los únicos datos son los de VANIER y col. [33], que, expresados en las mismas unidades que los anteriores, son los siguientes (los % molares de cerebro se han deducido extrapolando de una gráfica [40]):

	Cerebro		Cerebelo		
% molar	19 semanas gest.	Término	19 semanas gest.	1 día (niño desmaduro)	3 días
GT_1	22	11	28	29,5	26,4
GD_1b	11	6	15,6	11,6	10,2
GD_1a	28	46	28,7	29,1	21,6
GM_1	39	37	27,7	29,9	41,8

Según estos datos, VANIER y col. concluyen que no hay diferencias entre pattern cerebral y cerebelar en la vida fetal, pero para una muestra de 3 días de vida extrauterina encuentran ya una clara diferencia con un aumento en el % molar de GT_1, un descenso del % molar del ganglíosido mayoritario cerebral GD_1a y un aumento del % molar de GM_1.

En cuanto a la composición cerebelar ganglisídica en animales, podemos citar solamente a MERAT y DICKERSON (1973). Encuentran en la rata en los primeros días de vida extrauterina, que extrapolando corresponderían a las últimas semanas de vida fetal en el humano, la siguiente composición expresada en % molar respecto al total de las fracciones: GT_1, 30%; GD_1a, 50%; GD_1b, 20%, y GM_1 no lo determinan.

Los mismos autores encuentran en el cerdo, para el intervalo que va de los 93 días de vida fetal hasta el nacimiento, la siguiente composición expresada en las mismas unidades de % molar que en la rata: GT_1, 31%; GD_1a, 27%; GD_1b, 27%; GM_1, 15%.

Los datos hallados en el presente trabajo (tabla VII y fig. 12) indican: la distribución molar porcentual de los distintos gangliósidos no parece verse afectada por la edad de gestación. Empleando cifras promedio, la composición expresada en % molar del total de las distintas fracciones ganglisídicas, es la siguiente: GT_1, 18%; GD_1b, 20%; GD_1a, 25-30%; GM_1, 35%.

Comparando estos datos con los obtenidos en cerebro para las distintas edades de gestación, hallamos que la proporción de GT_1 en cerebelo expresada en % molar del total, difiere significativamente de la de cerebro con un riesgo alfa inferior a 0,05 a las 26-30 semanas de gestación, inferior a 0,001 a las 32-36 semanas de gestación e inferior a 0,01 término. Siendo siempre más alta en cerebelo la proporción molar respecto al total de GT_1. La proporción de GD_1b en % molar difiere también significativamente de la de cerebro en todas las edades de gestación estudiadas, siendo el riesgo alfa de error inferior a 0,01 a las 26-30 semanas; inferior a 0,02 a las 32-36 semanas e inferior a 0,01 a las 38-42 semanas. Siendo siempre más alta en cerebelo la proporción de GD_1b expresada en % del total. La cantidad de GD_1a expresada en % molar es siempre inferior en cerebelo en todas las eda-

des de gestación estudiadas, siendo el riesgo alfa de error inferior a 0,05 a las 26-30 semanas, inferior a 0,02 a las 32-36 semanas e inferior a 0,01 a término. Respecto a la fracción GM_1 expresada en % molar, no se ha encontrado diferencia significativa entre cerebro y cerebelo para ninguna de las edades de gestación estudiadas (tablas IV, V y VI).

En conjunto nuestros datos dan comparativamente con los otros autores un menor % molar de GT_1 y un mayor % molar de GM_1, si bien en el caso del trabajo de MERAT y DICKERSON [31] las diferencias observadas son probablemente debidas a que se refieren a especies animales distintas más que a diferencias en los sistemas de trabajo, puesto que en líneas generales emplean la misma metodología que en nuestro laboratorio.

Vemos, sin embargo, que hay una general coincidencia en asignar al pattern ganglisídico cerebelar, comparado con el cerebral, una mayor proporción del trisialoganglósido GT_1 y una menor proporción del ganglósido mayoritario cerebral GD_1a.

CONCLUSIONES

El intervalo entre las 18 semanas de gestación y el término de la misma es un período de gran crecimiento del sistema nervioso central que se refleja sólo en parte por el aumento ponderal de este tejido. El peso del encéfalo aumenta por un factor de cinco. Juntamente con este fenómeno tan aparente existe un cambio de la composición química del tejido de magnitud similar, que se caracteriza por el aumento del contenido lipídico y de alteración de la distribución de las distintas fracciones lipídicas, que resulta de las diferencias en los incrementos de cada una de ellas.

Las fracciones lipídicas que muestran un mayor aumento son los galactolípidos y la fracción fosfolipídica no saponificable. Los aumentos de fosfolípidos totales y el colesterol son muy aparentes pero menos marcados que las fracciones anteriores. Los proteolípidos sufren también incrementos en este período y en las distintas regiones que en términos generales coinciden con los aumentos de material lipídico.

Los cambios de distribución lipídica tisular ocurren en tiempos distintos, en regiones diferentes. Entre las 18 semanas y el término de la gestación los mayores incrementos de material lipídico se observan en la médula espinal y se acompañan de un cambio de la distribución de las fracciones lipídicas, en el sentido indicado en el párrafo anterior.

Considerando sucesivamente los resultados obtenidos en las distintas regiones topográficas en sentido ascendente, los aumentos lipídicos y los cambios en los procentajes de las fracciones individuales, son menos marcados y ocurren en períodos cada vez más tardíos. En tronco cerebral se inician coincidiendo con el período estudiado y su magnitud, aunque menor que en médula espinal, es remarcable: la concentración total de lípidos en el tejido se duplica y fracciones como los galactolípidos y la fracción fosfolipídica no saponificable se triplican. En cerebelo, un fenómeno similar se inicia hacia las 34 semanas de gestación. En lóbulos cerebrales los cambios del contenido

lipídico no se registran hasta la 38 semana de gestación en la que comienza a elevarse el contenido lipídico, aumentando fundamentalmente la fracción fosfolipídica. Los aumentos previsibles de la fracción galactolipídica son todavía indetectables.

Las características de los aumentos de las distintas fracciones lipídicas y su secuencia topográfica en el sistema nervioso central, permiten concluir que las variaciones detectadas son en su mayor parte reflejo de un mismo fenómeno que corresponde al reconocido por los histólogos con mielinización. Dejando aparte la coincidencia de las variaciones con los estudios de mielinización cuya correlación químico histológica queda fuera del objetivo del presente trabajo, los datos bioquímicos son suficientemente demostrativos. El acúmulo creciente de la menbrana mielínica, de composición predominantemente lipídica y a diferencia de otras estructuras subcelulares de un alto contenido en galactolípidos, esfingomielina y plasmalógenos (fracción fosfolipídica no saponificable) proteolípidos justifica los fenómenos observados.

En las regiones donde la mielinización química es más aparente (en médula espinal) ha sido posible la observación de diferencias en la progresión de los incrementos de componentes mielínicos en relación al tiempo de gestación. La concentración de galactolípidos progresa uniformemente a lo largo de todo el intervalo. El aumento de fosfolípidos totales ocurre principalmente en los primeros períodos. La fracción fosfolípica no saponificable muestra mayores incrementos en la primera mitad. Por el contrario el incremento del colesterol predomina en la última mitad, y los proteolidos aumentan predominantemente en la primera mitad.

El tronco cerebral donde el aumento de lípidos tisulares presenta un cierto retraso con respecto a la médula, se observa el mismo fenómeno de dispersión en los incrementos de las distintas fracciones aunque el cuadro no es exactamente superponible al de aquella región. El aumento de galactolípidos es uniforme al igual que en médula espinal. Los proteolípidos aumentan en la última parte del período y la fracción fosfolípidica no saponificable presenta aumentos superiores en la primera mitad del período.

Las diferencias en los modelos de incremento de los distintos componentes mielínicos no concuerdan con la existencia de un proceso de simple acumulación de una estructura de composición fija. Debe pues concluirse que o bien juntamente con el acúmulo de mielina coexisten otros fenómenos en los que participan las sustancias consideradas como específicas de la mielina o bien que la composición de la mielina varía a lo largo de la maduración. La segunda hipótesis resulta más verosímil especialmente a luz de los recientes datos aportados por otros autores. (Ver Discusión).

La concentración de NANA en cerebro sufre un incremento muy marcado, con un período de crecimiento lento hasta las 30 semanas de gestación que correspondería al período de multiplicación neuronal y glial, y un período que va de las 30 semanas hasta el nacimiento con un aumento muy rápido de la concentración llegando las cifras a duplicar las iniciales, y que se correspondería con el período de crecimiento y diferenciación dendrítica y establecimiento de sianpsis; observándose este hecho en todos los lóbulos

cerebrales estudiados (frontal, occipital y temporal). Revelándose aún más marcado el incremento de síntesis de NANA si se tiene en cuenta que en esta etapa el aumento ponderal del órgano es muy grande.

En cerebelo se observa un crecimiento de la concentración de NANA lipídico muy discreto alcanzando hacia el final del período solamente la mitad de la concentración hallada en cerebro. Lo cual indicaría que la síntesis de gangliósidos en el órgano aumenta debido esencialmente al aumento ponderal del mismo.

Las distintas fracciones gangliosídicas se distribuyen en forma característica a lo largo del período estudiado y sin que se observen diferencias regionales por lo que respecta a lóbulos frontal, occipital y temporal. Expresando los resultados en % molar del total de las fracciones la distribución es en líneas generales la siguiente: GT_1 12%; GD_1b 15%; GD_1a 40%; GM_1 33%. Observándose durante el período estudiado un aumento de la fracción GD_1a (que sin embargo no ha podido correlacionarse con el aumento de la edad de gestación); un aumento apenas perceptible de GM_1; una disminución de la misma magnitud de GD_1b y un descenso de la fracción GT_1, que está correlacionando con la edad de gestación con un riego alfa de error inferior a 0,01.

En cerebelo la distribución característica de los gangliósidos es sensiblemente distinta a la de cerebro. Expresando los resultados en las mismas unidades encontramos los siguientes porcentajes molares respecto al total: GT_1 18%; GD_1b 20%; GD_1a 28%; GM_1 34%. El modelo de distribución cerebelosa no presenta variaciones apreciables a lo largo del período estudiado.

Comparativamente respecto al cerebro el cerebelo presenta un mayor % molar de GT^1 y GD_1b y un menor % molar de GD_1a siendo estadísticamente significativas todas las diferencias respecto a lóbulos con riesgos alfa de error inferiores a 0,05.

BIBLIOGRAFIA

1. JOHNSON, A.C.; MCNAAB, A.R., y ROSSITER, R.J.: Biochem. J. 43, 573 (1948).
2. ERANTE, G.: Acta Physiol. Scand. 18 Supp. (1949).
3. SVENNERHOLM, L.: J. Neurochem. 11, 839 (1964).
4. CLAUSEN, J.; CHRISTENSEN, L., y ANDERSEN, H.: J. Neurochem. 12, 599 (1965).
5. SUZUKI, K.: J. Neurochem. 12, 969 (1965).
6. HOOGHWINKEL, G.J.M.: Pharm. Weekblad. 27, 35 (1969).
7. VANIER, M.T.; HOLM, M.; OHMAN, R., y SVENNERHOLM, L.: J. Neurochem. 18, 581 (1971).
8. FOLCH, J.; LEES, M., y SLOANE STANLEY, G.H.: J. Biol. Chem. 226, 497 (1957).
9. CHEN, TORIBARA y WARNER: Analyt. Chem. 28, 1756 (1957).

10. SORENSEN, M., y HAUGAARD, G.: Biochem. Z. 260, 247 (1933).
11. KEAN, E.L.: J. Lipid Res. 9, 319 (1968).
12. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L., y RANDALL, R.J.: Biol. Chem. 193, 265 (1951).
13. HEES, H.H., y LEWIN, E.: J. Neurochem. 12, 205 (1965).
14. SVENNERHOLM, L.: Biochem. Biophys. Acta. 24, 604 (1957).
15. MIETTINEN, T., y TAKKI-LUUKAINEN, I.T.: Acta Chem. Scand. 13.856 (1959).
16. SUZUKI, K.: Life Sci. 3, 1227 (1964).
17. SCHWARTZ, D.: Mèthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Ed. Médicales Flammarion. París, 1963, p. 212.
18. SCHWARTZ, D.: Id., p. 158.
19. SCHWARTZ, D.: Id., p. 119
20. DOBBING, J.: Applied Neurochemistry. Ed. A.N. Davison and J. Dobbing (1967).
21. MCILWAIN, H.: En «Biochemistry and the Central Nervous System». Boston, Mass. Little Brown (1959).
22. WELLS, A.M., y DITTMER, J.C.: Biochemistry. 6, 3169 (1967).
23. NORTON, W.T., y PODSULO, S.E.: J. Neurochem. 21, 759 (1973).
24. CUZNER, M.L.; DAVISON, A.N., y GREGSON, N.A.: J. Neurochem. 12, 499 (1965).
25. FOLCH, J., y LEES, M.: Biol. Chem. 191, 807 (1951).
26. GONZÁLEZ-SASTRE, F.: J. Neurochem. 17, 1049 (1970).
27. AMADUCCI, L.: J. Neurochem. 9, 153 (1962).
28. AMADUCCI, L.; PAZZAGLI, A., y PESSINA, G.: J. Neurochem. 9, 509 (1962).
29. WOOLLEY, D.W.: Nature. 202, 1074 (1964).
30. EICHBERG, J.: Biochem. J. 95, 114 (1964).
31. MERAT, A., y DICKERSON, J.W.T.: J. of Neurochem. 20, 873 (1973).
32. BASS, N.H.: Chemistry and brain development. Ed. R. Paoletti and A.N. Davison, Plenum Press. New York. London, p. 413 (1971).
33. VANIER, M.T.; HOLM, M.; OHMAN, R., y SVENNERHOLM, L.: J. of Neurochem. 18, 581 (1971).
34. SVENNERHOLM, L.: J. Neurochem. 10, 613 (1963).
35. SVENNERHOLM, L.: J. Neurochem. 11, 839 (1964).
36. HOOGHWINKEL, G.J.M.: Pharm. Weekblad. 104, 783 (1969).
37. MC ILWAIN, H.: Biochemistry and the Central Nervous System. Churchill, London, p. 180 (1955).
38. SCHWARTZ, D.: Mèthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Ed. Médicals Flammarion. París (1963), p. 168.
39. SUZUKI, K.: Inborn disorders of sphingolipid metabolism. Ed. Aronson, S.M., and Volk, B.W. Pergamon Press, p. 215 (1967).
40. VANIER, M.T. et al.: J. of Neurochem. 18, 586 (1971).

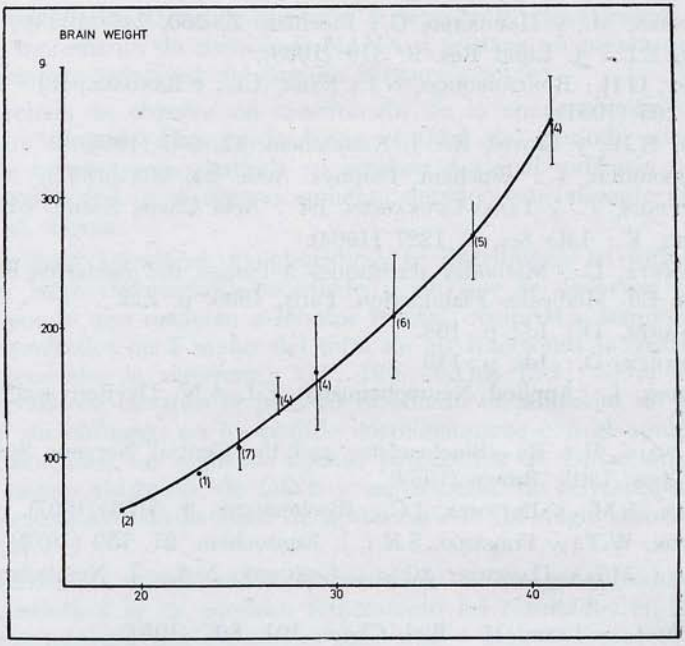


Fig. 1. — Crecimiento ponderal del encéfalo en el prematuro.
Ordenadas: Peso en gramos.
Abcisas: Semanas de gestación.

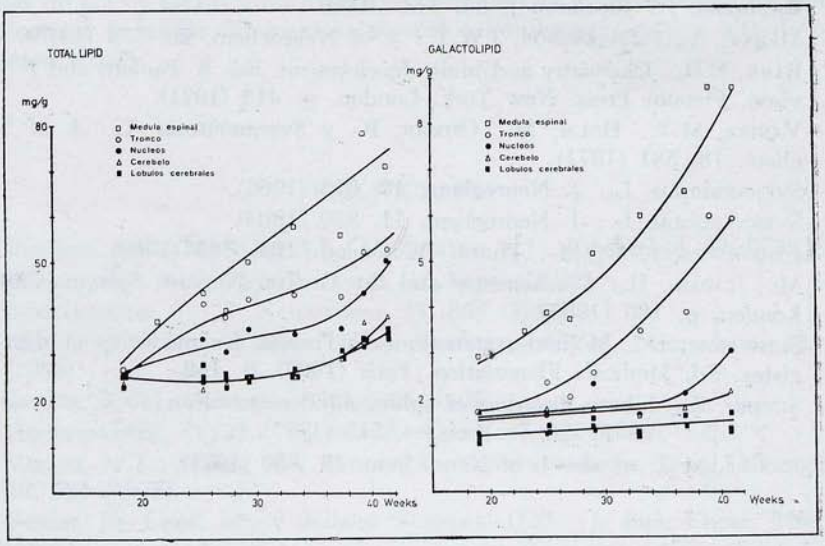


Fig. 2. — Total lipídico tisular.

Fig. 3. — Galactolípidos.

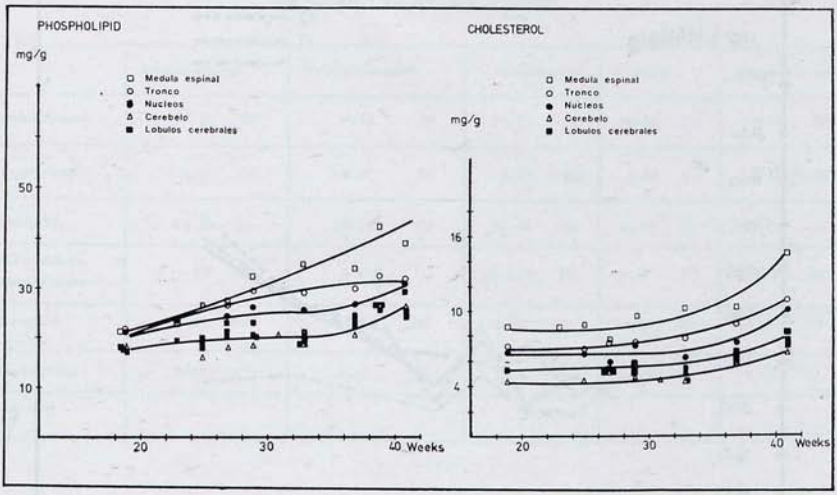


Fig. 4. — Fosfolípidos totales.

Fig. 6. — Colesterol.

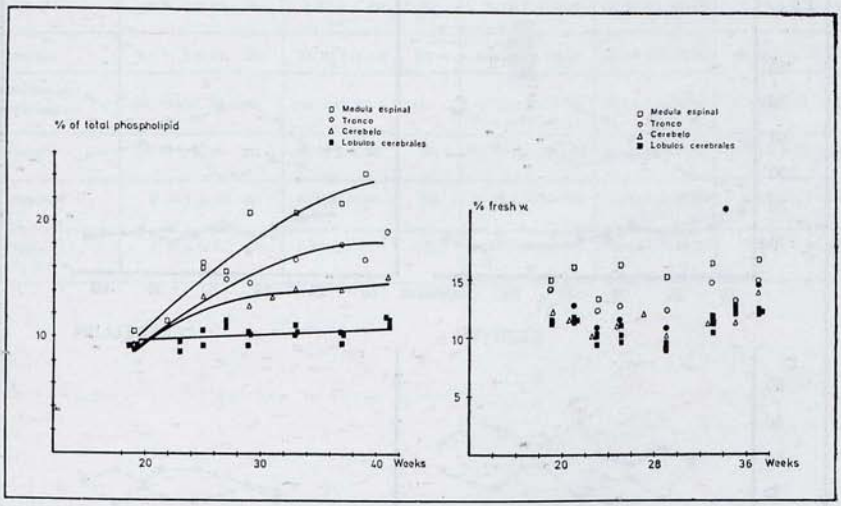


Fig. 5. — Fracción fosfolipídica no saponificable.

Fig. 7. — % del peso fresco) del tejido desecado.

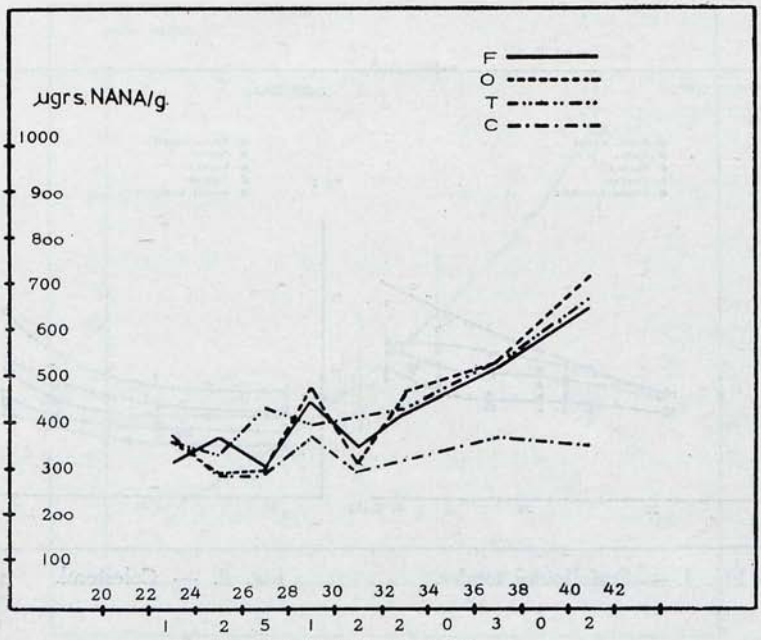


Fig. 8. — NANA total lipídico.

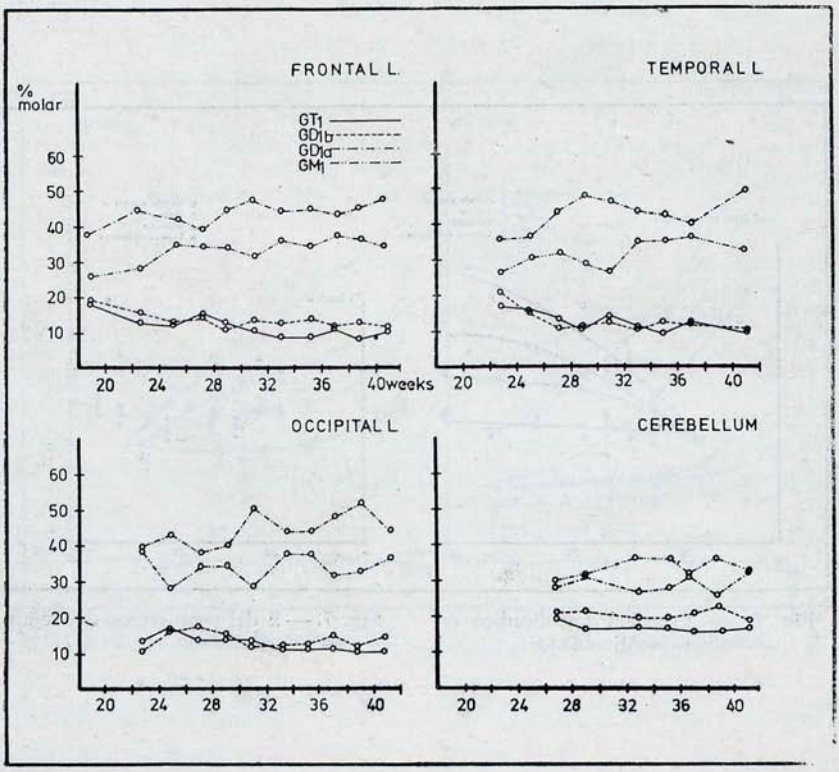


Fig. 9, 10, 11 y 12. — Fracciona miento gangliósidos.

TABLA I a

18-20 SEMANAS. LÍPIDOS TOTALES EN MG/G. DE TEJIDO. EL RESTO DE LOS VALORES EN μ MOLES/G. DE TEJIDO

	Médula espinal	Tronco cerebral	Cerebelo	Núcleos	Lóbulo frontal
Lípidos totales	27.01 (2)	25.22 (2)	26.70 (2)	26.47 (1)	23.58 (2)
Proteolípidos	2.37 (2)	2.07 (2)	1.27 (2)	1.59 (1)	0.85 (1)
Fosfolípidos	26.06 (2)	23.54 (2)	23.08 (2)	26.17 (1)	23.77 (2)
Fosfolípidos no- - saponificables	10.5% (2)	9.04% (1)	9.15 % (2)	14.1 (1)	9.1 % (2)
Colesterol	10.24 (1)	10.12 (2)	10.70 (2)	15.23 (1)	14.16 (2)
Galactolípidos	3.44 (2)	2.19 (2)	2.10 (2)	1.47 (1)	1.46 (2)
Sulfatidos	-	-	-	-	-

TABLA I b

32-34 SEMANAS. LÍPIDOS TOTALES EN MG/G. DE TEJIDO. EL RESTO DE LOS VALORES EN μ MOLES/G. DE TEJIDO

Lípidos totales	58.09 ± 9.33 (5)	43.01 ± 4.68 (5)	25.35± 2.47 (5)	34.77± 3.01 (4)	27.71 ± 2.49 (5)
Proteolípidos	4.51 ± 2.56 (4)	2.77 ± 1.40 (5)	1.56 ± 0.55 (5)	2.03 ±0.80 (4)	1.58 ± 0.63 (5)
Fosfolípidos	41.11 ± 4.60 (4)	36.82 ± 5.03 (5)	23.57 ± 3.00 (5)	32.41 ± 3.51 (4)	26.53 ± 2.17 (5)
Fosfolípidos no- - saponificables	20.70%±5.14 (5)	16.72±3.94 (4)	14.05 ± 2.13 (4)	12.14 ± 3.49 (4)	11.0%±1.95 (5)
Colesterol	26.47 ± 5.95 (5)	20.09 ± 6.67 (5)	11.40 ± 1.64 (5)	15.90±0.72 (4)	14.12 ± 1.77 (5)
Galactolípidos	6.00 ± 2.10 (5)	4.34 ± 1.20 (5)	2.12 ± 0.48 (5)	1.98 ± 0.51(4)	1.55 ± 0.33 (5)
Sulfatidos	2.30 ± 0.53 (3)	1.41 ± 0.41 (2)	0.68 ± 0.35 (3)	0.42 ± 0.06(3)	0.29 ± 0.05 (3)

Tabla I c

40-42 semanas. Lípidos totales en mg/g. de tejido. El resto de los valores en μ moles/g. de tejido

Lípidos totales	71. 02 ± 2. 97 (3)	52. 96 ± 4. 50 (3)	34. 48±4. 38 (3)	51. 34±5. 47 (4)	35. 42 ± 2. 59 (4)
Proteolípidos	4. 92 ± 2. 43 (4)	4. 57 ± 0. 81 (3)	3. 04± 0. 50 (4)	2. 54±0. 43 (3)	1. 54 ± 0. 28 (4)
Fosfolípidos	49. 11 ± 3. 85 (3)	40. 83 ± 1. 51 (3)	33. 43±2. 29 (3)	41. 22±4. 20 (4)	33. 92 ± 2. 60 (4)
Fosfolípidos no-saponificables	24. 0 (1)	19. 21 ± 3. 42 (3)	15. 16%±4. 31 (3)	11. 67 % (2)	11. 6% ± 1. 35 (4)
Colesterol	43. 06 ± 8. 71 (3)	29. 03 ± 1. 67 (3)	17. 36±3. 37 (3)	26. 10±1. 87 (3)	19. 58 ± 0. 67 (4)
Galactolípidos	9. 66 ± 2. 18 (3)	6. 49 ± 1. 47 (3)	2. 67± 0. 51 (3)	3. 77±0. 69 (4)	1. 60 ± 0. 37 (4)
Sulfatidos	3. 09 ± 0. 66 (4)	2. 24 ± 0. 40 (3)	0. 82 ± 0. 07 (3)	0. 94±0. 41 (3)	0. 31 ± 0. 06 (4)

Tabla II a

El número de casos es el indicado entre paréntesis. Junto a la media hay una sola desviación standard

26 - 30 semanas gestación	LOBULO FRONTAL	LOBULO OCCIPITAL	LOBULO TEMPORAL	CEREBELO
GT_1 % molar	13, 3 ± 2, 09 (6)	12, 6 ± 2, 2 (7)	12, 3 ± 2, 0 (6)	17, 6 ± 3, 1 (3)
GD_1b % molar	12, 1 ± 2, 69 (6)	14, 5 ± 3, 0 (7)	11, 3 ± 2, 2 (6)	20, 3 ± 2, 33 (3)
GD_1a % molar	42, 9 ± 8, 3 (6)	40, 3 ± 10, 6 (7)	45, 9 ± 7, 7 (6)	29, 5 ± 6, 6 (3)
GM_1 % molar	33, 1 ± 4, 3 (6)	32, 5 ± 7, 6 (7)	30, 4 ± 5, 2 (6)	33, 5 ± 3, 3 (3)
grs NANA/gr. tejido fresco	0, 325 ± 0, 083 (6)	0, 324 ± 0, 100 (6)	0, 420 ± 0, 104 (6)	0, 303 ± 0, 031 (6)

Tabla II b

El número de casos es el indicado entre paréntesis.
Junto a la media hay una sola desviación standard

32 – 36 semanas gestación	LOBULO FRONTAL	LOBULO OCCIPITAL	LOBULO TEMPORAL	CEREBELO
GT_1 % molar	8, 9 ± 2, 1 (6)	9, 4 ± 1, 6 (3)	10, 1 ± 2, 8 (6)	16, 8 ± 1, 55 (3)
GD_1b % molar	12, 8 ± 3, 7 (6)	10, 9 ± 1, 9 (3)	11, 6 ± 3, 6 (6)	19, 7 ± 1, 05 (3)
GD_1a % molar	43, 7 ± 8, 4 (6)	42, 9 ± 7, 4 (3)	42, 1 ± 6, 5 (6)	26, 8 ± 2, 56 (3)
GM_1 % molar	34, 6 ± 3, 6 (6)	36, 7 ± 7, 6 (3)	36, 0 ± 3, 3 (6)	36, 6 ± 3, 05 (3)
grs NANA/gr. tejido fresco	0,412 – 0, 077 (3)	0, 423 – 0, 077 (3)	0, 462 – 0, 054 (3)	0, 321 – 0, 035 (3)

Tabla II c

El número de casos es el indicado entre paréntesis.
Junto a la media hay una sola desviación standard

38 – 42 semanas gestación	LOBULO FRONTAL	LOBULO OCCIPITAL	LOBULO TEMPORAL	CEREBELO
GT_1 % molar	8, 8 ± 1, 68 (4)	8, 3 ± 0, 9 (4)	11, 2 ± 4, 3 (4)	16, 6 ± 2, 42 (3)
GD_1b % molar	11, 6 ± 2, 84 (4)	11, 8 ± 3, 8 (4)	9, 9 ± 2, 0 (4)	20, 2 ± 2, 33 (3)
GD_1a % molar	45, 7 ± 3, 1 (4)	45, 6 ± 6, 7 (4)	46, 2 ± 7, 2 (4)	29, 5 ± 6, 6 (3)
GM_1 % molar	33, 8 ± 1, 84 (4)	34, 2 ± 3, 1 (4)	32, 5 ± 3, 8 (4)	33, 5 ± 3, 3 (3)
grs NANA/gr. tejido fresco	0, 634 ± 0, 054 (3)	0, 698 ± 0, 070 (3)	0, 663 ± 0, 028 (3)	0, 359 ± 0, 107 (3)

Tabla III

Gangliósidos totales

El NANA está expresado en grs. NANA/gr. tejido fresco.
Las cifras son valores promedio.
El número de casos es el indicado entre paréntesis

	22-24(1)	24-26(1)	26-28(5)	28-30(1)	30-32(2)	32-34(2)	36-38(3)	40-42(2)
LCB. FRONTAL	311	372	301	445	344	417	520	641
LOB. OCCIPITAL	373	285	293	480	311	463	522	721
LOB. TEMPORAL	363	335	427	393	408	428	517	656
CEREBELO	355	298	289	375	297	310	365	341

Tabla IV

Lóbulo frontal % molar de las fracciones de gangliósidos.
El número de casos es el indicado entre paréntesis

	18-20 (1)	22-24(2)	24-26(2)	26-28(3)	28-30(3)	30-32(3)	32-34(3)	34-36(3)	36-38(4)	38-40(1)	40-42(3)
GT_1	17,8	12,1	11,8	14,7	12,1	10,5	8,8	8,7	10,2	7,5	9,2
GD_{1a}	16,9	15,5	12,2	13,8	10,3	13,1	12,2	13,4	11,8	12,6	11,3
GD_{1b}	38,0	45,0	41,5	38,1	44,3	46,0	43,6	44,0	42,6	44,6	46,1
GM_1	25,3	27,4	34,5	33,4	33,3	30,4	35,4	33,9	36,2	35,3	33,4

Tabla V

Lóbulo occipital % molar de las fracciones de gangliósidos.
El número de casos es el indicado entre paréntesis

	22-24(2)	24-26(3)	26-28(3)	28-30(4)	30-32(3)	32-34(1)	34-36(2)	36-38(3)	38-40(1)	40-42(3)
GT_1	12,5	15,4	12,4	12,5	12,3	9,7	9,3	9,3	8,1	8,5
GD_{1b}	9,3	14,9	16,5	14,0	10,4	10,9	10,9	13,5	9,7	12,3
GD_{1a}	39,6	42,1	37,2	39,8	50,0	43,0	43,0	47,1	51,0	43,9
GM_1	38,6	27,6	33,9	33,9	27,3	36,5	36,6	30,1	31,2	35,3

TABLA VI

LÓBULO TEMPORAL % MOLAR DE LAS FRACCIONES DE GANGLIÓSIDOS. EL NÚMERO DE CASOS ES EL INDICADO ENTRE PARÉNTESIS

	22-24(1)	24-26(3)	26-28(3)	28-30(3)	30-32(3)	32-34(3)	34-36(2)	36-38(2)	40-42(3)
GT_1	17,0	16,9	13,7	10,8	14,6	10,4	9,7	12,2	9,1
GD_{1b}	21,0	15,3	10,8	11,9	12,5	10,5	12,3	11,7	9,2
GD_{1a}	35,5	36,9	43,5	48,0	46,1	43,2	42,5	40,0	49,5
GM_1	26,5	30,9	32,0	29,3	26,8	35,9	35,5	36,4	32,2

TABLA VII

CEREBELO % MOLAR DE LAS FRACCIONES DE GANGLIÓSIDOS. EL NÚMERO DE CASOS ES EL INDICADO ENTRE PARÉNTESIS

	26-28(1)	28-30(2)	32-34(2)	34-36(1)	36-38(2)	38-40(1)	40-42(2)
GT_1	19,7	16,5	16,8	16,8	15,8	15,6	16,8
GD_{1b}	21,0	21,2	19,7	19,7	21,0	22,8	18,9
GD_{1a}	28,6	31,1	26,9	27,1	31,1	25,6	31,8
GM_1	30,7	31,2	36,6	36,4	32,0	36,0	32,5