

AÏLLAMENT D'UNA ACTIVITAT TRIACILGLICÈRID HIDROLASA A FETGE DE NADÓ DE RATA*

MANUEL REINA i SENÉN VILARÓ

*Càtedra de Fisiologia General. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.*

** Aquest treball rebé el Premi per a Estudiants del curs 1983-84 instituit
per la Societat Catalana de Biologia.*

SUMMARY

The validation process of an affinity chromatography on heparine-Sepharose method is described. This method allows to resolve hepatic lipase (LH) from lipoprotein lipase (LPL) in a distinctly differentiated way. It is applied on the purification of both LH from adult rat liver and white adipose tissue LPL.

The way some different factors affect the percentage of extraction of one or another of these enzymes has been also studied. It has been-observed that the LH one increases in a 24 % of the total due to heparine and sonication, while sonication makes the one of white adipose tissue LPL increase in a 37 %.

Finally, this method is applied to the separation and semi-purification of newborn rat liver LPL, wich is clearly similar in its chromatographyc behavior to the enzyme obtained from white adipose tissue. This fact gives new additional evidence of the lipoprotein-lipase nature of this hepatic enzyme.

Key-words: Lipoprotein lipase; newborn rat liver; hepatic lipase; affinity chromatography; heparine-Sepharose.

INTRODUCCIÓ

La Lipoproteïna lipasa (LPL) (E.C.3.1.1.34) és l'enzim responsable de la captació per part dels teixits de la major part dels triacilglicèrids plasmàtics circulants que formen part de quilomicrons (QM) o lipoproteïnes de molt baixa densitat (ROBINSON, 1970). La seva localització funcional és a la superfície

de l'endoteli, lligada a la superfície cel·lular per mitjà d'un heparà o un dermatà sulfat (OLIVECRONA i col., 1977). En aquesta propietat es basa una tècnica molt emprada en la purificació d'aquest enzim: la cromatografia d'afinitat amb suport de heparina-Sepharosa.

Les activitats més elevades de LPL es detecten al teixit adipós (KORN i QUIGLEY, 1955;

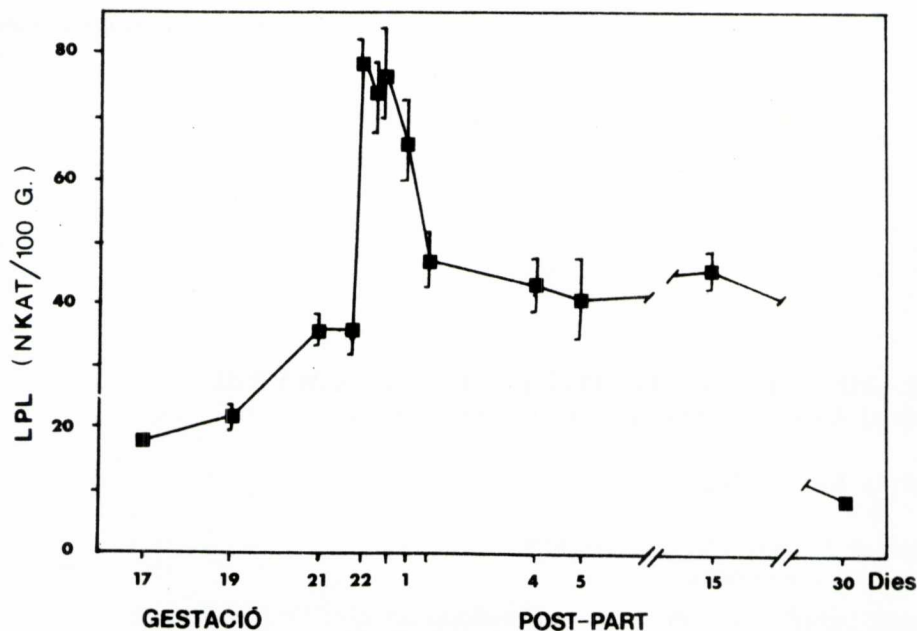


Fig. 1. Perfil d'activitat lipoproteïna lipasa en fetge de nadó de rata, entorn al part. Aquest perfil s'ha elaborat en base a diferents treballs realitzats al nostre laboratori.

KORN, 1957), cor, múscul esquelètic (KORN, 1955), glàndula mamària (MC BRIDE i KORN, 1963), pulmó (HAMOSH i HAMOSH, 1957) i aorta (HENSON i SCHOTZ, 1975).

Com que s'ha considerat sempre al fetge com un òrgan exportador de triacilglicèrids (VLDL), hom assumia com a lògic que no presentés activitat LPL, enzim de clar sentit importador de triacilglicèrids. En aquest sentit, el fetge presenta un altre enzim, la lipasa hepàtica (LH), el qual és capaç d'hidrolitzar triacilglicèrids «in vitro» però que «in vivo» no sembla actuar eliminant triacilglicèrids plasmàtics. Quan s'injecta antisèrum antilipasa hepàtica a animals experimentals es produeix una important acumulació de colesterol i fosfolípid a lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) plasmàtiques, però no es troben afectades les concentracions de triacilglicèrids plasmàtics (KUUSI i col., 1979). Així, es postula que una possible funció de la lipasa hepàtica podria constituir en l'eliminació de colesterol i fosfolípids de LDL i HDL en el

seu pas a través del fetge (NILSSON-EHLE i col., 1982).

Malgrat tot això, en el nostre laboratori, LLOBERA i col. (1979) van descriure la presència d'activitat semblant a la LPL al fetge de nadó de rata. Posteriorment, al nostre laboratori, altres autors han confirmat l'existència d'aquesta activitat (GRINBERG, 1982) (veure fig. 1).

En un model d'ajornament del part, RAMIREZ (1981) trobà que l'aparició d'aquesta activitat enzimàtica al fetge només es dona als nadons i no als fetus post-madurs. També al nostre laboratori, GRINBERG (1982) confirmà l'existència d'aquest pic d'activitat al fetge dels nadons de rata, tot observant una clara correlació directa entre activitat de l'enzim i acúmulo de triacilglicèrids al fetge. Així, la presència d'aquest enzim podria permetre al fetge jugar un paper d'acúmulo de triacilglicèrids, fins que el teixit adipós blanc es desenvolupés funcionalment.

Un problema greu amb el que topen aquests estudis rau en que els resultats de la

quantificació de l'enzim que s'estudia poden estar fortament emmascarats per la presència d'elevades activitats de lipasa hepàtica. En efecte, els mètodes actuals de valoració d'ambdós enzims no són prou específics, i la lipasa hepàtica hidrolitza «in vitro» el substrat emprat per a valorar LPL, amb un creuament d'activitat de l'ordre del 30 al 40 %. Per tot això ens plantejarem la separació d'ambdues activitats mitjançant la posta a punt d'un sistema de cromatografia en heparina-Sepharosa descrit a la bibliografia per a plasma post-heparínic (BOBERG i col., 1977), i la seva adequació al fetge de nadó.

PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

Per assolir el nostre objectiu planificarem tres fases experimentals:

1. Posta a punt de la tècnica descrita a la bibliografia sobre plasma post-heparínic.
2. Aplicació de la metodologia a la semipurificació de LPL de teixit adipós i de LH de fetge d'animal adult. Aquest enzims podrien ésser utilitzats com a patrons en la separació cromatogràfica dels enzims de fetge de nadó.
3. Estudi del fetge de nadó.

MATERIAL I MÈTODES

Animals

Es van fer servir rates Wistar de l'animalari de la Càtedra de Fisiologia General de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

— com a font de teixits (fetge i teixit adipós blanc) tant rates mascles com femelles de 200 a 300 g.

— com a font de plasma post-heparínic, tant rates mascles com femelles de 200 a 240 g.

— com a font de fetge de cria vàrem fer servir nadons obtinguts del creuament de femelles de 200 a 250 g amb mascles de l'estoc de cria de l'animalari. Els nadons eren ali-

mentats 8 h després del part i mantinguts 16 h en dejú en un bany termostatitzat a 37 °C (GRINBERG, 1982).

Pols acetònica

Els teixits es van obtenir per decapitació de l'animal i dissecció ràpida, i es varen congelar amb nitrogen líquid (−192 °C). La delipidació de les mostres (necessària donat el mètode radioquímic emprat en la valoració d'activitats lipàsiques) es va fer mitjançant obtenció de pols acetònica.

Plasma post-heparínic

El plasma post-heparínic es va obtenir per injecció i.v. d'una solució d'heparina sòdica (Sigma) a una dosi de 33 U.I./100 g de pes corporal. La sang es va obtenir per decapitació de l'animal, tot recollint-la sobre EDTA (Merck). El plasma s'obtingué per centrifugació a 2.000 rpm, 30 min a 4 °C.

Cromatografia d'afinitat heparina-Sepharosa

Tècnica descrita per OLIVECRONA (1971) per purificar activitat LPL. Basada en la utilització d'un suport rígid, la Sepharosa, a la qual s'uneix covalentment heparina, la qual s'ha demostrat (EGELRUD i OLIVECRONA, 1977) que s'uneix amb la lipoproteïna lipasa, mitjançant interacció iònica.

Hem fet servir gel heparina-Sepharosa CL-6B (Pharmacie) com a suport i també Barbitol (Merck) 5 mM, pH = 7,2 amb diferents concentracions de NaCl com a eluents (0, 0,5, 0,75, 0,9 i 1,5 M NaCl). Una solució de BSA (Sigma) lliure d'àcids grassos 10 % fou utilitzada com a estabilitzador.

El gel inflat segons el protocol subministrat amb el producte, era empaquetat en columnes de 0,6 × 5 cm (3 ml de gel), amb un volum de 50 ml de també Barbitol 0,5 M NaCl, en cambra freda (4 °C).

La mostra a cromatografiar fou plasma post-heparínic o pols acetònica de teixits. El

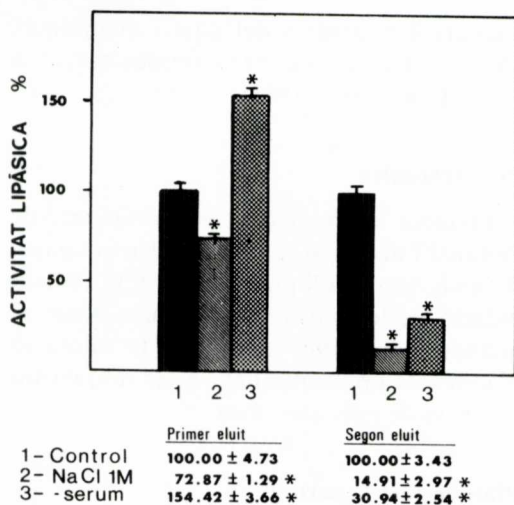


Fig. 2. Efecte del NaCl 1M de l'absència de sèrum en el medi de valoració sobre les activitats lipàsiques eluides a 0,75 M NaCl i a 1,5 M NaCl. (* = $p < 0.05$; S-mètode; Scheffé; 1959).

plasma post-heparínic va ser afegit a 1/2 volum de tampó Barbitol 1,5 M NaCl, centrifugat a 2.200 rpm 20 min i 4 °C i aplicat a la columna. En el cas dels teixits la redissolució de la pols acetònica es va fer en tampó Barbitol 0,5 M NaCl i s'ultracentrifugà amb un rotor Beckman Ty75 a 21.400 rpm (30.000 xg), 30 min i 0-4 °C, utilitzant el sobrenedant.

Una vegada aplicada la mostra, es varen fer tres eluits amb tampó Barbitol a 0,5, 0,9 i 1,5 M NaCl (50, 37 i 30 ml respectivament). Els eluits segon i tercer es recolliren en fraccions de 1,5 ml. Tot el procés es va fer en cambra freda.

A cada fracció dels eluits així com al redissolt, sobrenedant i al rentat a 0,5 M NaCl es quantificaren les activitats LPL i LH i el seu contingut en proteïna total. Per tal d'augmentar l'estabilitat dels enzims, les mostres destinades a la valoració d'activitat es conservaren amb BSA (lliure d'AGLI) (10 µl al 10 % per cada 200 µl) i -80 °C.

Després de cada cromatografia, la columna es va reequilibrar amb 50 ml de tampó Barbitol 0,5 M NaCl.

Mètodes de quantificació

a) Activitats enzimàtiques

Per valorar activitat LPL vàrem utilitzar un mètode descrit per NILSSON-EHLE i SCHOTZ (1976) i modificat posteriorment per COREY i ZILVERSMITH (1977).

Per valorar LH vàrem utilitzar un mètode descrit per EHNHOLM (1975).

b) Proteïnes

Les proteïnes varen ésser quantificades per un mètode descrit per LOWRY i col. (1951) amb modificacions posteriors de ZAK i COHEN (1961).

RESULTATS

Fase 1: Plasma post-heparínic

Després d'un seguit de proves amb diferents modalitats d'elució les condicions òptimes per a la separació de LPL i LH (veure fig. 4) varen ser:

- lligat de la mostra a 0,5 M NaCl.
- rentat amb $\times 15$ vegades el volum de gel amb tampó Barbitol 0,5 M NaCl.
- eluits a 0,75 i 1,5 M NaCl, tot trobant-se al primer pic eluit l'activitat LH, i al segon l'activitat LPL (volums d'elució de 37,5 i 30 ml respectivament).

Amb una fracció rica en activitat triacilglicèrid hidrolasa de cada eluit es va mesurar l'efecte de la presència de NaCl 1 M i de l'absència de sèrum al medi de reacció. L'activitat del primer eluit presenta una inhibició lleugera per NaCl 1 M i una activació en un medi carent de sèrum mentre que l'activitat del segon eluit s'inhibeix fortament per NaCl 1 M i per absència de sèrum. D'aquesta manera poguem confirmar que havíem separat dues activitats enzimàtiques diferents del plasma post-heparínic. A més, el seu comportament ens permeté caracteritzar-les com LH (primer eluit) i LPL (segon eluit) (veure fig. 2).

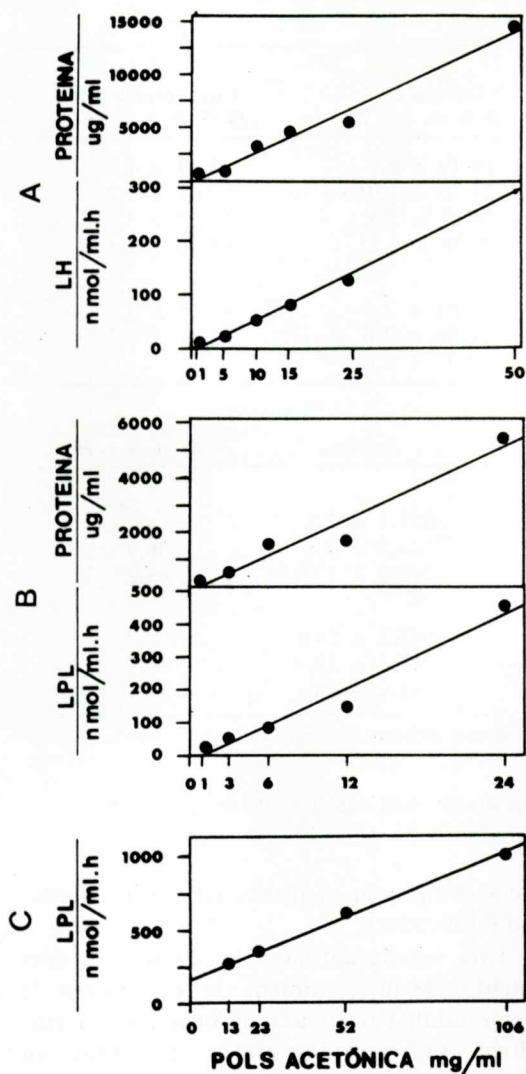


Fig. 3. Efecte de la concentració de pols acetònica sobre l'alliberació de proteïna i activitat enzimàtica de fetge d'adult (A), teixit adipós blanc (B) i fetge de nadó (C).

Fase 2: Fetge i teixit adipós blanc

En aquest cas, la semipurificació suposa l'estudi de les condicions més adequades per al processament de la mostra prèvia a la cromatografia d'afinitat (essencialment quant a la redissolució de la pols acetònica). En aquest sentit, vàrem comprovar que l'alliberació d'activitat enzimàtica i proteïna al

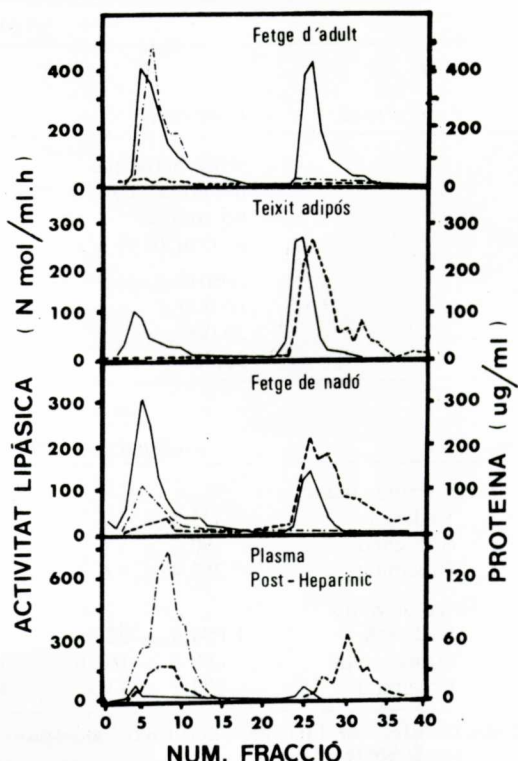


Fig. 4. Perfil cromatogràfic en heparina-sepharosa de les diferents fonts enzimàtiques utilitzades en aquest treball. Les condicions d'elució foren per plasma post-heparínic, fetge d'adult i teixit adipós blanc 0,75 M NaCl fins la fracció 20 (1,5 ml/fracció), de la fracció 21 a la 40 1,5 M NaCl. Per fetge de nadó l'elució es va fer a 0,9 i 1,5 M NaCl, respectivament.

— Proteïna.
 --- Activitat LH.
 --- Activitat LPL.

sobrenedant de la ultracentrifugació era lineal en el marge de 1 a 50 mg/ml de pols acetònica per a fetge adult i de 1 a 24 mg/ml per a teixit adipós blanc (veure fig. 3). En el primer cas recuperàvem al sobrenedant un 16 % de l'activitat LH i en el segon un 26 % de l'activitat LPL. Per tal d'augmentar la recuperació d'activitat vàrem provar diferents mètodes que descrivim a continuació.

Quant a LH, la presència d'heparina a concentracions de 100 U.I./ml augmenta l'alliberació d'activitat al sobrenedant fins a un 34 %, però no interfereix el lligam de l'enzim a la columna cromatogràfica d'hepari-

TAULA I

TEIXIT				
Fetge d'adult	Condicions	Activitat L.H. (S % vs. S + P)		Conc. proteïna (S % vs. S + P)
	sense heparina	16,19 ± 0,7		45,13 ± 1,6
	heparina 100 U.I/ml	23,70 ± 1,9*		50,67 ± 9,2
	no sonicat	14,23 ± 3,4		53,27 ± 3,5
	sonicat (4 × 1')	30,36 ± 5,2*		63,36 ± 2,8
	centrifugació:			
	10.000 g	21,01 ± 2,3		42,13 ± 3,5
	20.000 g	16,96 ± 3,6		37,13 ± 4,2
	30.000 g	14,37 ± 2,0		
No sonicat		Sonicat		
	Activitat	% vs. S + P	Activitat	% vs. S + P
<i>Teixit adipós blanc</i>				
Redissolt	335,5 ± 5,7	—	335,4 ± 7,2	—
Sobrenedant	90,7 ± 1,6	26,2	124,5 ± 4,8	36,8*
Precipitat	255,4 ± 4,6	73,8	213,9 ± 13,4	63,2*
<i>Fetge de nadó</i>				
Redissolt	1.094,4 ± 22,0	—	887,2 ± 24,8	—*
Sobrenedant	608,5 ± 162,6	51,5	747,4 ± 15,7	68,5
Precipitat	572,2 ± 13,3	48,5	343,9 ± 7,6	31,5*

Taula I. Efecte de diferents factors sobre l'alliberació d'activitat o proteïna al sobrenedant.

S: Sobrenedant.

P: Precipitat.

Significativitat: test t-Student, tractament vs no tractat; *p < 0.05 Activitat LPL en nmol/ml.h.

na-Sepharosa. La redissolució dels precipitats no augmenta la recuperació d'activitat al sobrenedant. La sonicació (4 × 1 min., 1 min. de repòs en bany de gel) no té cap efecte inactivador de l'activitat LH, i augmenta la recuperació d'aquesta al sobrenedant fins a un 30 %. Amb diferents forces d'ultracentrifugació (10.000, 20.000 i 30.000 xg) no s'aprecien diferències significatives quant a la recuperació d'activitat LH al sobrenedant (veure taula I).

Per a la LPL es va provar l'efecte de la sonicació, trobant-se que no té un efecte inhibidor sobre l'activitat LPL i que augmenta la recuperació d'activitat al sobrenedant fins a un 37 % (veure taula I). No vàrem provar l'efecte de l'heparina donat que es descriu un efecte activador de l'activitat LPL a la bibliografia (IVERIUS i col., 1972; TWU i col., 1975; GUERRIER i PELLET, 1980), efecte que

hem comprovat al nostre laboratori (dades no publicades).

Una vegada definides les condicions adequades de processament de les mostres de fetge adult i teixit adipós blanc, es va realitzar una cromatografia d'afinitat en heparina-Sepharosa (veure fig. 4) i trobarem:

— que l'activitat lipasa hepàtica s'elueix característicament a 0,75 M NaCl, i no apareix gens d'aquesta activitat al segon eluit (1,5 M NaCl).

— que l'activitat LPL a teixit adipós blanc s'elueix a 1,5 M NaCl.

El grau de purificació aconseguit amb aquest procediment ha estat 34 vegades per LH a fetge adult, i de 265 vegades per LPL de teixit adipós blanc (havent-hi fraccions amb enriquiment de 2.800 vegades respecte al sobrenedant).

Fase 3: Fetge de nadó

Es va determinar la linealitat en l'alliberació d'activitat mesurada pel mètode LPL en el marge de concentracions fins a 100 mg/ml. La recuperació d'activitat era del 51 % (veure fig. 3).

En sonicar un redissolt de 50 mg/ml de pols acetònica de fetge de nadó l'activitat valorada pel mètode LPL augmenta (la recuperació passa a ésser d'un 68 %), encara que experimenta un descens significatiu de l'activitat total mesurada al redissolt, indicant que aquest enzim no resisteix la sonicació (veure taula I).

En realitzar una cromatografia d'afinitat amb mostra de fetge de cria, vàrem haver de canviar les condicions d'elució ja que l'activitat LH no era eluida en la seva totalitat a 0,75 M NaCl. Les noves condicions foren:

— lligat i rentat amb tampó Barbitol 0,5 M NaCl.

— eluits a 0,9 i 1,5 M NaCl (amb els mateixos volums que abans).

Amb aquestes condicions aconseguírem resoldre dos pics d'activitat lipàsica: un al primer eluit (0,9 M NaCl) que ha de correspondre a LH, i un altre al segon eluit (1,5 M NaCl) (veure fig. 4), sens dubte corresponent a un enzim diferent de l'anterior, de comportament semblant a la LPL de teixit adipós blanc. El pic d'activitat LPL al primer eluit pot explicar-se per efecte del creuament de l'activitat LH amb el mètode LPL.

La purificació assolida és de l'ordre de 80 vegades, tant per l'activitat LH (primer eluit) com per l'activitat LPL (segon eluit).

DISCUSSIÓ

En aquest treball posem a punt un mètode de cromatografia d'afinitat en heparina-Sepharosa, ja descrit a la bibliografia, que permet resoldre en dos pics clarament diferenciats la lipasa hepàtica (LH) de la lipoproteïna lipasa (LPL). Efectivament, la LH (present a plasma post-heparínic i a fetge pe-

rò no a teixit adipós blanc, resistent al NaCl 1 M i parcialment inhibida per la presència de sèrum al medi d'incubació) elueix de la columna cromatogràfica a 0,75 M NaCl, mentre que la LPL (present a plasma post-heparínic i a teixit adipós blanc però no a fetge adult, sensible a NaCl 1 M i depenent del sèrum) no elueix fins a 1,5 M NaCl.

En aplicar aquesta tècnica cromatogràfica al fetge de nadó, s'obté, a més de l'activitat típica del fetge, la LH, un pic d'activitat de comportament cromatogràfic semblant al de la LPL de teixit adipós blanc i de plasma post-heparínic. Posteriors estudis hauran de permetre una caracterització més acurada d'aquest enzim que, sens dubte, ha de tractar-se d'un isoenzim de la lipoproteïna lipasa.

La presència atípica, al fetge de nadó de rata, d'activitat lipoproteïna lipasa pot capacitar aquest òrgan per captar directament els triacilglicèrids circulants en forma de QM i procedents de la ingesta de la llet materna. És sabut que la rata neix amb un teixit adipós blanc molt poc desenvolupat funcionalment, de forma que el camí per a la utilització de greixos que s'esdevé en l'animal adult (per exemple durant el dejuni: QM a teixit adipós blanc gràcies a la seva LPL, esterificació, lipòlisi que rendeix àcids grassos lliures, els quals viatgen cap al fetge per a ser beta-oxidats fins a cossos cetònics per a la seva utilització per teixits perifèrics) es fa pràcticament impossible, malgrat la situació de forta demanda energètica en què es troba el nadó. Així doncs, la presència de LPL al fetge faria molt més curta la via d'utilització dels lípids materns (QM a fetge gràcies a la seva LPL i beta-oxidació fins a cossos cetònics).

Concordant amb aquesta hipòtesi, Ferrer i col. (1978) descriu que en alimentar amb dieta rica en triacilglicèrids a nadons de rata, la velocitat de cetogènesi hepàtica augmenta fins a valors molt elevats des de les 0 a les 24 h postpart. Aquest augment coincideix en el temps amb l'aparició de l'activitat hepàtica semblant a la LPL que descrivim. El

desfaçament entre l'entrada de TAG a fetge i la sortida en forma de cossos cetònics suposa un increment de triacilglicèrids hepàtics tal com descriu en RAMÍREZ i col. (1983) i GRINBERG (1982) al nostre laboratori.

BIBLIOGRAFIA

- BOBERG, AUGUSTIN, J., BAGINSKY, M.L., TEJADA, P. i BROWN, W.V., Quantitative determination of hepatic and lipoprotein lipase activities from human post-heparin plasma. *J. Lipid Res.*, 18: 544-547 (1977).
- COREY, J.E. i ZILVERSMITH, D.B., Validation of a stable emulsion for the assay of lipoprotein lipase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 89: 666-674 (1977).
- EGELRUD, T. i OLIVECRONA, T., The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk. *J. Biol. Chem.*, 247: 6.212-6.217 (1972).
- ENHOLM, C., SHAW, W., GRETEN, H. i BROWN, W.V., Purification from human plasma of a heparin-released lipase with activity against triglyceride and phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 250: 6.756-6.764 (1975).
- FERRE, P., PEGORIER, J.P., WILLIAMSON, D.H. i GIRARD, J.R., The development of ketogenesis at birth in the rat. *Biochem. J.*, 176: 759-765 (1978).
- GRINBERG, D.R., Memoria de Licenciatura, Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona (1982).
- HAMOSH, M. i HAMOSH, P., Lipoprotein lipase in rat lung. The effect of fasting. *B.B.A.*, 380: 132-140 (1975).
- HENSON, L.C. i SCHOTZ, M.C., Detection and partial characterization of LPL in bovine aorta. *B.B.A.*, 409: 360-366 (1975).
- IVERIUS, P.H. i OSTLUND-LINDQUIST, A.M., Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization and molecular weight analysis. *J. Biol. Chem.*, 251: 7.791-7.795 (1976).
- KORN, E.D., Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I-Isolation and characterization of the enzyme from anormal rat heart. *J. Biol. Chem.*, 215: 1-14 (1955).
- KORN, E.D. i QUIGLEY, T.W., Studies on lipoprotein lipase of rat heart and adipose tissue. *B.B.A.*, 18: 143-145 (1955).
- KORN, E.D., Inactivation of lipoprotein by heparinase. *J. Biol. Chem.*, 226: 827-837 (1957).
- KUUSI, T., KINNUNEN, P.K.J. i NIKKILA, E.A., Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins «in vivo». *FEBS Lett.*, 104: 384-388 (1979).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., i RANDALL, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-271 (1951).
- LLOBERA, M., MONTES, A. i HERRERA, E., Lipoprotein lipase activity in liver of the rat fetus. *B.B.R.C.*, 91: 272-277 (1979).
- MC BRIDE, O.W. i KORN, E.D., The lipoprotein lipase of mammary gland and the correlation of its activity to lactation. *J. Lipid Res.*, 4: 17-20 (1963).
- NILSSON-EHLE, P. i SCHOTZ, M.C., A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.*, 17: 536-541 (1976).
- NILSSON-EHLE, P., Regulation of lipoprotein lipase. A «Metabolic Risk Factors in Ischemic Cardiovascular Disease», L.A. Carlson & B. Pernow (1982).
- OLIVECRONA, T., EGELRUD, T., IVERIUS, P.H. i LINDAHL, U., Evidence for an ionic binding of lipoprotein lipase to heparin. *B.B.R.C.*, 43: 524-529 (1971).
- OLIVECRONA, T., BENGTSSON, G., MARKALUND, S.E., LINDAHL, U. i HOOK, M., Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Fed. Proc.*, 36: 60-65 (1977).
- RAMÍREZ, I., Memoria de Licenciatura, Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona (1981).
- RAMÍREZ, I., LLOBERA, M. i HERRERA, E., Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism*, 32: 333-341 (1983).
- ROBINSON, D.S. i WING, D.R., Regulation of adipose tissue clearin factor lipase activity. A Adipose tissue, regulation and metabolic function, B.J. Renaud ed., (1970).
- SCHEFFE, H., A «The analysis of variance», pp. 55-87, John Wiley and Sons, New York (1970).
- ZAK, B. i COHEN, J., Automatic analysis of tissue culture proteins with stable Folin reagents. *Clin. Chim. Acta*, 6: 665-670 (1961).