

M 306

CM 306

Universidade Federal de Santa Catarina

Absorção Lipídica Pela Membrana Do Enterócito

Nelson Cabral Jr

Trabalho de Conclusão de Curso

Julho de 1994

Índice

1) Introdução	01
2) Revisão	03
3) Camada de água não agitada	05
4) Antitransportador de Na ⁺ e H ⁺	07
5) Membrana em borda de escova	13
6) Proteína citoplasmática carreadora de ácidos graxos	15
7) Absorção passiva de lipídeos	19
7.1) Dissociação das micelas compostas no lúmen intestinal	20
7.2) Adsorção e penetração no folheto externo da BBM	23
7.3) Equilíbrio com o folheto interno da BBM	25
7.4) Absorção pela FABP _c	28
8) Absorção mediada por proteínas	28
9) Conclusão	29
10) Referências	30

1) INTRODUÇÃO

Para serem absorvidos, lipídeos devem atravessar a dupla camada lipídica da membrana em borda de escova (BBM) do enterócito. Isto deve ocorrer através de um movimento passivo ou através de um transporte mediado por proteína [Borgstrom et al. 1957, 1977, Johnston 1968, Shiau 1987, Sallee et al. 1972, Westergaard 1987, Thomson e Dietschy 1981]. Evidências de absorção passiva incluem:

1) na maioria dos estudos, a velocidade da absorção lipídica é uma função linear da concentração,

2) competição entre lipídeos por sítios de absorção não tem sido demonstrado, e;

3) o coeficiente de permeabilidade da membrana para vários lipídeos aumenta com a hidrofobicidade dos mesmos, com uma relação linear entre o número de grupos CH_2 e o coeficiente de permeabilidade passiva [Borgstrom et al. 1957; Borgstrom 1977; Johnson 1968; Shiau 1987; Sallee et al. 1972; Westgaard 1987; Thomson e Dietschy 1981].

Evidência de um componente mediado por proteína incluem dados de estudos do uso de um anticorpo contra uma membrana presente na BBM, denominada de FABP_{pm} [Stremmel et al. 1985a]. Um anticorpo específico contra esta proteína carreadora de ácidos graxos (anti- FABP_{pm} -Ab) diminui significativamente a absorção lipídica pela BBM em estudos utilizando segmentos intestinais perfundidos, enterócitos isolados e vesículas [Stremmel et al. 1986a, 1986b, Stremmel 1990].

Além disso lipídeos podem ter o coeficiente de permeabilidade passiva alterada como resultado da atividade do antitransportador de Na^+ e H^+ . A absorção do ácido fólico e oligipeptídeos, por exemplo, é modulado pela presença de microclima ácido adjacente à BBM [Lucas et al. 1975]. Este microclima ácido é mantido pela atividade do antitransportador de Na^+ e H^+ [Shimada e Oshi 1987, 1988 Shimada 1987].

Estas proteínas têm sido descritas na BBM e na membrana basolateral do enterócito [Acra et al. 1991, Orsenigo et al. 1990, Knickelbein et al. 1988]. O MA do enterócito também parece ser importante para a absorção de outros ácidos orgânicos fracos como ácidos graxos [Lucas 1984]. Um aumento artificial no pH do micromeio diminui a absorção de ácido oleico nos sacos evertidos intestinais [Shiau 1990, Lucas et al. 1976, Lucas 1984a, 1984b].

Baixo pH pode influenciar a absorção de lipídeos em pelo menos três vias:

1) a concentração micelar crítica ácidos graxos e colesterol esta aumentada em pH baixo (aumentando assim a dissociação das micelas compostas e resultando em um aumento da capacidade de absorção);

2) em pH baixo a maioria dos ácidos graxos estão em forma protonada; aumentando assim sua hidrofobicidade e sua habilidade de solubilização dentro da BBM; e

3) ácidos graxos protonados equilibram-se mais rápido entre os dois folhetos da BBM [Carrey e Small 1979, Small et al. 1984].

Para manter o MA, alguma barreira deve estar interposta entre a BBM e o conteúdo luminal. A existência de uma camada de água não agitada (UWL) e uma camada de muco adjacente à BBM tem sido demonstrada em animais e em humanos [Lucas et al. 1975b, Said et al 1987]. A composição eletrolítica e o pH desta capa de muco parece ser constante [Lucas 1984a,1984]. Uma interessante propriedade do muco é a sua capacidade de diminuir a difusão lateral de íons H^+ , agindo assim como um agente na restrição na difusão de H^+ .

Além disso, a interação de ácidos graxos livres com muco produz uma diminuição adicional na difusão lateral de H^+ [Sarosiek et al. 1984]. Shiau et al. [1990] demonstrou que a presença de uma camada de mucina acídica facilita a dissociação da micela e a difusão de ácidos graxos e que o MA tem um papel crucial na absorção intestinal de ácido oleico.

Na presente revisão, a absorção de ácidos graxos pela BBM é revisada, levando-se em conta estes fatores

2) REVISÃO

A membrana intestinal em borda de escova não é mais considerada como uma dupla camada lipídica inerte que separa o interior da célula do meio externo [Singer e Nicolson 1972]. Ao invés disso, ela é agora reconhecida como um sítio onde as células interagem ativamente com o meio externo [Meddings 1988, 1989, 1990]. A BBM é capaz de adaptar sua composição em resposta à dieta, diabetes, radiação, lesões, ingestão de etanol, ressecção intestinal e idade [Karasov e Diamond 1987, Grey et al. 1984].

A maioria das células dos vertebrados são expostas a um meio constante e nunca encontram uma grande variação no nível de substrato. Portanto, diferentemente de certas bactérias e leveduras, não necessitam de regulação substrato-dependente de suas enzimas. [Diamond 1991]. A BBM do enterócito, entretanto, é uma exceção, visto que os níveis de substâncias nutrientes podem variar de refeição para refeição. No relativo curto tempo de vida do enterócito, a BBM é transposta passiva e ativamente por um grande número de diferentes substâncias. O intestino deve adaptar a sua capacidade de absorção de nutrientes e adaptar-se as mudanças vindas do meio interno e externo [Diamond 1991].

Por décadas a absorção passiva através da BBM tem sido proposta como o único mecanismo.[Borgstrom et al. 1957, Borgstrom 1977, Johnston 1968, Shiau 1987, Sallee et al. 1972, Westergaard 1987, Thomson e Dietschy 1981]. O princípio fundamentando a virtual impermeabilidade da dupla camada lipídica para íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e outros nutrientes hidrosolúveis. Estes nutrientes para permearem a BBM, necessitam de ajuda de um sistema de transporte protéico ou, através da via paracelular [Madara 1989]. Por outro lado, substâncias lipofílicas como ácidos graxos livres e colesterol, difundem-se livremente através da dupla camada da BBM sem a ajuda de um sistema de transporte protéico [Brodie et al. 1957, Hogben et al. 1959]. As propriedades hidrofóbicas dos

lipídeos, no entanto, criam um problema de solubilidade luminal e citoplásmico que deve ser superado para permitir seu transporte e metabolização. [Small 1970].

O objetivo deste estudo é abordar de uma maneira fisiológica a interação dos lipídeos com a BBM: uma vez digerido em seus componentes básicos pelas enzimas pancreáticas, os lipídeos, para serem absorvidos devem atravessar duas barreiras: a camada de água não agitada (UWL) e a BBM [Revisado em Thomson e Dietschy 1981 e em Shiau 1987]. A UWL é formada por muco hidratado e uma série de lamelas de água que se estendem do exterior da BBM, e que progressivamente vão até as camadas imperceptivelmente com a fase luminal. A composição iônica e o pH da UWL podem ser diferentes do conteúdo luminal [Lucas 1984a, 1984b]. O pH da UWL em diferentes modelos animais, tem sido reportado como abaixo de 6 e é relativamente independente do pH luminal [Lucas 1984a, 1984b]. Esta região de baixo pH é conhecida como microclima ácido (MA) [Lucas et al.]. Este microclima ácido pode alterar a velocidade de penetração do soluto, por alterar a relação entre as formas ionizadas e não ionizadas do soluto. [Lucas 1984a, 1984b]. Por exemplo, a absorção do ácido fólico é aumentado na presença de um baixo pH. Má absorção de ácido fólico tem sido descrito quando o pH do microclima é alto [Lucas et al. 1976, 1978a, 1978b]. A presença de um microclima ácido pode também alterar a absorção de lipídeos. O pH dos ácidos graxos em uma solução aquosa é próximo a 4.8, desta maneira, em um pH próximo a 6 uma porção significativa de ácidos graxos esta na forma protonada. Ácidos graxos protonados são mais hidrofóbicos do que os não-protonados, e favorecem na sua difusão dentro da BBM [Brodie et al. 1957, Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. Síndromes de má absorção, como espru tropical e doença celíaca, estão associados com uma elevação anormal do pH no MA [Lucas et al. 1976, Lucas e Mathan 1989]. O baixo pH na UWL é mantido pela atividade de uma enzima chamada cotransportador de sódio e hidrogênio (NHE) [Shimada e Oshi 1987, 1988]. Muitas observações confirmam o conceito que lipídeos penetram passivamente na BBM: 1) a velocidade da absorção lipídica é uma função linear da concentração, com nenhum componente de saturação demonstrado na maioria dos estudos [Revisado em Thomson e Dietschy 1981]; 2) competição ou deslocamento

de receptores lipídicos não tem sido convincentemente demonstrado [Meddings 1988]; 3) o coeficiente de permeabilidade da membrana por uma série de provas lipídicas aumenta com a hidrofobicidade da prova [Revisado em Thomson e Dietschy 1981]; 4) lipídeos podem ser absorvidos por lipossomas, um sistema de dupla camada lipídica sem proteínas [Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. A absorção passiva de lipídeos é convencionalmente idealizado ocorrer pelos seguintes passos [Revisado em Shiau 1987, Glickman 1980] : 1) lipídeos são solubilizados em micelas compostas dissociam-se destas micelas; 2) lipídeos adsorvam-se e penetram no folheto externo da BBM e 3) são captados por uma proteína citoplasmática específica em transporte lipídico (FABPc).

3) A CAMADA DE ÁGUA NÃO AGITADA (UWL)

A presença de uma camada de água não agitada (UWL) adjacente à BBM tem sido confirmada por diferentes técnicas em diferentes modelos experimentais [Dietschy 1971; Thomson 1981, 1982a]. A UWL constitui uma considerável barreira para a absorção de nutrientes [Thomson e Dietschy 1980].

O movimento de solutos através da UWL ocorre via difusão simples no qual a velocidade do movimento é determinado pela espessura funcional da UWL, pela a área de UWL, pela constante difusão aquosa do soluto e pelo gradiente de concentração entre o conteúdo luminal e a BBM [Revisado em Thomson e Dietschy 1981]. A composição iônica da UWL parece ser uniforme, com concentrações constantes de H^+ , K^+ , Na^+ e Cl^- [Lucas 1984a; Shepard 1989]. Por exemplo, o pH da UWL menor do que 6 em diferentes modelos animais e em humanos, sendo relativamente independente do pH do conteúdo luminal [Lucas et al. 1975, Lucas et al. 1976, Lucas e Mathan 1989; Shiau 1990]. Esta região de baixo pH não pode ser explicado exclusivamente com base na UWL: uma camada em muco adjacente à BBM contribue para manter este microclima [Shiau et al. 1985, Shepard 1989].

O muco intestinal é secretado pelas células mucóides intestinais, também chamadas de goblet cells [Neutra e Forstner 1987]. Estas células epiteliais são encontradas em todo o trato gastrointestinal, incluindo as glândulas salivares,

esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, vesícula e ductos pancreáticos. As células mucóides estão polarizadas e localizadas na superfície da mucosa e no epitélio invaginado da mucosa e submucosa das glândulas e criptas [(Neutra e Forstner 1987)]. O muco intestinal é composto de glicoproteínas, água, várias macromoléculas celulares e séricas, eletrólitos e células mortas [Allen 1981].

A composição química, estrutural e funcional do muco é similar ao longo de todo o trato gastrointestinal [Allen 1981, Sellen e Allen 1989]. A consistência tipo gel do muco é devido ao seu maior componente protéico, a mucina [Allen 1981, Neutra e Forstner 1987]. A mucina é uma glicoproteína com oligossacarídeos ligados à Ser(thr)-GalNac por uma cadeia polipeptídica [Neutra e Forstner 1987]. A proteína pode ser dividida em pelo menos três domínios estruturais maiores. A cadeia de domínio central consiste de uma ordem de aproximadamente 100 tandem repetidos em 23 aminoácidos cada. Esta região de 2300 aminoácidos é 60% Thr, e potencialmente e excessivamente glicosilado. O terminal carboxílico tem aproximadamente 984 aminoácidos em comprimento, com um alto conteúdo de Thr, Ser e Cys. Uma vez secretado, a mucina agrupa-se como um sistema de gel, isto é, as macromoléculas em soluções ligadas entre si (pelo menos uma ligação por cadeia) dando origem a uma infinita rede [Allen 1981, Neutra e Forstner 1987]. Este arranjo especial da mucina dá ao muco a sua característica de viscoelasticidade e pode contribuir para outras propriedades físicas, como sua habilidade de retardar a difusão iônica [Saroziak et al. 1983a, 1983b, 1984]. Inicialmente, supunha-se que o muco intestinal tivesse uma função meramente protetora [Silberberg e Meyer 1982, Neutra e Forstner 1987]. Entretanto, evidências recentes sugerem um papel mais importante do muco intestinal, influenciando na absorção de nutrientes e na distribuição iônica na superfície epitelial [Guth e Engelhardt 1989, Mantle et al 1990]. Por exemplo, o muco intestinal modula a absorção de ferro pelo enterócito e esta modulação parece ser relatada às propriedades físicas do muco intestinal [Wien e Van Campen 1991]. É descrito um tipo de mucina no intestino com alta afinidade pelo colesterol a qual é apto a ligar-se ao colesterol de um modo estoiquiométrico. A esta captação de colesterol pela mucina ocorre durante a incubação de segmentos

intestinais com solução contendo colesterol e resultam em um mais alto nível de absorção de colesterol. A mucina pode portanto modelar a propriedade de absorção jejunal.

As propriedades físicas do muco intestinal também parecem ser importantes para manutenção do MA [Shiau et al 1985]. Difusão lateral de H^+ é significativamente reduzido em mucina, comparado com a difusão de H^+ na água ou salina. Purificado glicoproteico de muco, reduz a permeabilidade de H^+ em 90%, quando comparado com salina. Mais ainda, quando ácidos graxos ligam-se covalentemente a mucoproteínas, a difusão lateral de H^+ é ainda mais lenta [Saroziak et al. 1983a, 1983b, 1984]. Extração de lipídeos neutros, glicolipídeos e fosfolipídeos associados com mucosa gástrica canina reduz em significativamente a habilidade do muco retardar a difusão de H^+ . Muco ácido facilita a dissociação de ácido oleico das micelas compostas, com isso aumentando a quantidade de ácidos graxos livres disponíveis para a absorção [Shiau 1987, 1990].

4) O ANTITRANSPORTADOR DE NA^+ e H^+ (NHE)

Acredita-se que a alta concentração de H^+ no microclima seja gerado pela atividade da NHE [Shimada e Oshi 1987, 1988]. A NHE é uma proteína transportadora e está presente na maioria, se não em todas as células dos mamíferos, que media a troca de NA^+ por H^+ [Grinstein et al. 1989]. A troca NA^+/H^+ tem sido detectada na BBM e membrana basolateral dos enterócitos isolados do jejuno e do íleo [Acra et al. 1991, Orsenigo et al. 1990,]. No íleo do coelho, o NHE é detectado em enterócitos isolados da cripta e do vilo [Sundaram et al. 1991]. Anticarreadores com diferentes propriedades cinéticas estão presentes na BBM e membrana basolateral destas células [Orsenigo et al. 1990]. Não há dados disponíveis sobre o NHE ao longo do eixo cripto-vilosidade jejunal.

Diferentes isoformas de NHE tem sido descritas [Grinstein et al. 1989]. A isoforma NHE-1 está presente em quase todos os tecidos incluindo a membrana basolateral do intestino. A isoforma NHE-2 está presente na BBM do intestino, no rim e na glândula adrenal, mas sua função é desconhecida. A terceira isoforma, NHE-3,

é específica das células epiteliais e está presente no intestino e rim de humanos e coelhos embora não se saiba sua localização na BBM e na membrana basolateral [Tse et al. 1992]. As isoformas foram classificadas com base na afinidade e cinética do NA^+ , sensibilidades para amiloride e análogos e as suas regulações por mensageiros secundários. A NHE-1 e a NHE-2 tem afinidade similar para NA^+ , mostram evidência de sítios modificadores internos, têm diferente sensibilidade para o análogo de amiloride, etilsopropilamiloride (não para o amiloride ; Ki 50 mM para NHE-1 e 100 mM para NHE-2), e são estimulados por esterres de forbol e soro. Em estudo recente em jejuno humano, o Ki para amiloride na BBM foi aproximadamente 100 mM e na membrana basolateral foi aproximadamente [Gleeson 1992].

Inibição por amiloride é uma característica própria do NHE da membrana plasmática das células animais. Amiloride é um substituto do anel pirazínico com dois grupos aminos unidos nas posições 3 e 5 do anel, um cloro na posição 6, e uma acilguanidina na posição 2 [Grinstein et al. 1989]. No pH fisiológico, o amiloride está predominantemente na forma protonada como um cátion monovalente; esta forma de carga positiva é a forma ativa como bloqueador do NHE [Benos 1982]. Amiloride parece inibir o NHE por competição com o NA^+ . Substituição alquila na posição 5 potencializa a habilidade da molécula original para inibir atividade do NHE. Alguns destes são 100 vezes mais potentes do que o próprio amiloride. Modificação do terminal nitrogênio guanidino diminui a potência do amiloride [Benos 1982]. Em adição a amiloride, guanidinium e muitos derivados guanidinium como guanachior, e alcalóides como quinidine e harmaline inibem a NHE [Kinsella e Aronson 1980, Parker 1983]. A sensibilidade para amiloride e derivados tem sido usado para classificar e diferenciar diferentes isoformas de NHE nas células animais [Grinstein et al. 1989]. A tabela 1 lista os mais comuns análogos de amiloride e suas relativas eficácias e seus efeitos em outros sistemas de transportes.

É geralmente aceito que a estequiometria da troca de NA^+ / H^+ é de um para um [Grinstein e Rothstein 1986]. Compatível com a estequiometria, o sistema é eletroneutro, isto é, a ativação ou inibição da NHE não tem efeito direto no potencial de membrana [Grinstein et al. 1984], e uma alteração no potencial de membrana não

tem efeito na sensibilidade ao amiloride na troca Na^+/H^+ . Em condições fisiológicas, NHE opera expulsando o H^+ e captando o Na^+ [Aronson 1985]. Além do Na^+ , o NHE pode transportar Li^+ e provavelmente NH^+ mas não K^+ , Rb^+ ou cátions orgânicos como choline ou N-metil D-glucamine [Aronson 1985]. A densidade de NHE em linfócitos, como taxado por análise de Scatchard, é estimado ser um máximo de aproximadamente 8000 anticarreadores por célula, com um turnover de aproximadamente 2500 movimentos/sec [Dixon et al. 1987].

Droga	Peso Molecular	K_i (μM) do Sistema Inibido			Propriedades Físicas	
		canal de Na^+	NHE	anti-carreador	pK	% em água x etanol
5-(N-Methyl-N-isobutyl)Amiloride	299,70	> 300	0,44	135	8,1	6
5- (N, N-Hexamethyl) Amiloride	311,80	> 400	0,16	100	8,5	7
5- (N-Methyl-N-GCN) Amiloride	342,15	-	1,36	1.571	9,2	94
5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)Amiloride	299,73	> 300	0,04	130	8,4	6
Dihidrato Hidroclorídrico	302,13	0,34	83,4	110	48,7	99

A interação externa de Na^+ com NHE é compatível com um único sítio de ligação [Aronson et al. 1982]. A dependência do transporte de Na^+ no H^+ interno é , entretanto, consideravelmente mais difícil [Aronson et al. 1982]. Esta observação e o efeito assimétrico do H^+ quando presente do lado de fora da célula , guiou estes autores a postular a existência de um sítio modificador alostérico confinado no lado citoplasmático da NHE. Devido a ação deste sítio modificador alostérico, o NHE tornou-se virtualmente inativo na variação fisiológica do pH; enquanto em um pH baixo, a protonação do sítio modificador aumenta a atividade do NHE [Aronson et al. 1982, Grinstein e Rothstein 1986, Seifter e Aronson 1986]. Por outro lado, a diminuição da atividade da NHE no pH fisiológico pode proteger a célula da

alcalinização. [Grinstein e Rothstein 1986]. O NHE da BBM aparentemente não possuem modificador interno [Dudeja et al. 1991a].

A troca de H^+ por NA^+ é o único mecanismo envolvido na expulsão de H^+ pelas células [Grinstein et al. 1989]. Simultaneamente com o mecanismo independente de expulsão de bicarbonato, tem um papel central no controle do pH intracelular [Busa e Nucitelli 1984, Grinstein et al. 1984, 1986, 1989, Aronson 1985]. Embora a troca NA^+/H^+ seja osmoticamente neutra, como consequência da expulsão de H^+ , a dissociação de tampões intracelulares resulta em uma rede de ganho de NA^+ [Grinstein et al. 1984]. Muitas células, incluindo eritrócitos [Parker 1983], linfócitos [Grinstein et al. 1984] e algumas células epiteliais usam este mecanismo para recuperar volume celular, por exemplo, depois de contração hiperosmótica. Adicionalmente, células mutantes sem NHE [Grinstein et al 1989], tem demonstrado dificuldade em adquirir estas funções.

No enterócito, entretanto, a ativação do NHE e a ativação do segundo antiporter (CL^-/HCO_3^-) poderá aumentar o CL^- citoplasmático promovendo então uma saída através da 'membrana basolateral [Aronson et al. 1983, Seifer e Aronson 1986].A ativação de NHE pode levar a três consequências imediatas: alcalinização do citoplasma; um aumento na concentração intracelular de NA^+ ; um aumento na absorção celular de água [Grinstein e Rothstein 1986]. Nas células que tem a troca NA^+/CA^{++} , mudanças na concentração intracelular de NA^+ pode levar a um aumento na concentração intracelular de CA^{++} [Grinstein et al 1984]. Johnson e Epell [1976] sugeriram pela primeira vez o envolvimento da ativação da NHE com proliferação celular.

Um grande ímpeto nos estudos de anticarreadores foi observado posteriormente. Cinco linhas de evidência suportam este conceito [Grinstein et al. 1989] : 1) virtualmente todos os agentes que promovem crescimento ativam o NHE [Grinstein e Rothstein 1987]; 2) em alguns sistemas, alcalinização do citoplasma induz a proliferação [Mazia e Ruby 1974, L'Allemain et al. 1984, Rozengurt 1986]; 3) a resposta proliferativa depende do NA^+ extracelular [Johnson et al. 1976]; 4)

inibidores de NHE podem bloquear o crescimento celular [Johnson et al. 1976]; 5) abaixo de certas condições, o crescimento é diminuído em células mutantes sem anticarreador. Entretanto, todos os elos entre a proliferação celular e o NHE são indiretos, e dados de relação diretas não tem sido demonstrados. A questão “a ativação do NHE é primária ou secundária ao evento da proliferação celular?” permanece ser respondida [Grinstein et al. 1989]. A importância do NHE para proliferação intestinal ou adaptação intestinal é desconhecida mas, é interessante que a atividade do NHE nas células intestinais está aumentada no diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, uma condição no qual é associado com aumento da absorção intestinal de glicose e lipídeos [Dudeja et al. 1991a].

As funções do NHE no intestino, além do papel desempenhado na proliferação celular, incluem: 1) absorção eletroneutra de NaCl; 2) regulação de pH intracelular; 3) regulação do volume intracelular; e 4) manutenção do MA.

Evidências sugerem que a absorção eletroneutra de NaCl é devido a troca Na^+/H^+ junto com $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ [Knickerbein et al. 1988]. Semelhantemente a outras células, os enterócitos usam NHE para regular o pH interno e o volume celular [Shimada 1987, Grinstein et al. 1984, 1986, 1989, Sundaram et al. 1991, Cohen et al. 1990]. A manutenção do MA na superfície da BBM é resultado da atividade do NHE [Shimada e Oshi 1987, 1988].

Compatível com esta opinião é a alteração observada no pH do microclima em condições que alteram a atividade do NHE, como a perfusão do intestino com soluções livres de Na^+ ou com soluções contendo amiloride no qual aumenta o pH do microclima [Shimada e Oshi 1987]. Este efeito no pH do microclima pode indiretamente afetar a absorção de outros ácidos orgânicos fracos como o ácido fólico e ácidos graxos, alterando a relação entre formas conjugadas e ionizadas do soluto [Lucas 1984a, 1984b].

Ácidos graxos podem trazer alterações significativas na atividade de vários sistemas de transportes da BBM do intestino delgado, interagindo diretamente com o transporte protéico ou abolindo a energia inicial, que é necessária para o transporte

do processo. Em vesículas da BBM, o ácido oleico inibe a atividade do NHE [Tiruppathi et al. 1988]. A inibição do NHE por ácido oleico não é devido ao aumento do gradiente de H^+ . É devido a interação direta do ácido graxo com o transporte proteico visto que a associação ácido oleico na redução da absorção de Na^+ é similar na presença e na ausência de gradiente H^+ . A inibição do NHE intestinal por ácido oleico é parcialmente reversível. Pouca inibição é notada com os ácidos octanóico, mirístico, palmítico e esteárico, enquanto que a absorção de Na^+ é inibida em 50% com ácido láurico, em 35% inibida com ácido oleico, e 15%, 10%, e 5% com ácidos linoleico, linolênico e ricinoleico, respectivamente.

A absorção de D-glicose e L-alanina está reduzido na presença de 500 M de ácido oleico e dipeptídeo por BBMV [Tiruppathi et al. 1988]. Quando analisado na presença de um gradiente definido internamente de Na^+ , o transporte da D-glicose e da L-alanina é inibido por ácidos graxos. Isto sugere que a inibição foi devido ao aumento do gradiente de Na^+ , ao contrário de um efeito direto nos sistemas de transporte. Incubação de vesículas da BBM de coelho com ácido oleico leva a incorporação de ácido graxo para dentro da BBM, no qual pode alterar a fluidez da membrana e por isso mudar a atividade de certos transportes protéicos [Merril et al. 1987]. A ativação do NHE media a rede de transporte Na^+ e H^+ [Grinstein et al. 1984]. Quando a concentração do gradiente de Na^+ transmembrânico é termodinamicamente balanceado por um equivalente mas oposto a um gradiente de H^+ (i. e. $[Na^+]_o/[Na^+]_i = [H^+]_o/[H^+]_i$), nenhuma rede de movimento destes íons ocorre. A única força guia é a combinação dos gradientes de Na^+ e H^+ na direção oposta, sem a intervenção da energia de reações metabólicas [Grinstein e Rothstein 1986]. H^+ gerado por atividades metabólicas do enterócito, como o metabolismo da glicose e a divisão celular, são ativamente expulsos na troca com Na^+ no lúmem intestinal. Isto pode explicar o efeito da glicose em diminuir o pH do MA: o metabolismo da glicose produz lactato, CO_2 e H^+ , por isso ativa o antiporter com H^+ trocado por Na^+ [Lucas et al. 1980, Shiau 1990]. Uma vez que o H^+ está exteriorizado do enterócito, a camada de mucina diminui a difusão do H^+ de volta ao lúmem

intestinal [Shiau e Levine 1980, Shiau et al. 1985, Saroziek et al. 1984, Lucas 1984a, 1984b, Allen 1981, Forlong et al. 1990].

Baseado este conceito, perfusão do lúmen intestinal com soluções livre de Na^+ , tratamento do intestino com inibidores da anidrase carbônica, inibidores da divisão celular ou agentes mucolíticos, todos têm mostrado aumentar o pH do MA [Shimada e Oshi 1988]. A espessura do gradiente de pH é por volta de 900- 1300 mM comparável com a espessura da UWL [Said et al. 1986, 1987a, 1987b]. O tratamento de segmentos da mucosa jejunal com ouabaína, um inibidor da membrana basolateral Na^+/K^+ -ATPase, aumenta o pH e diminui a espessura do microclima. O mecanismo pelo qual a ouabaína inibe a atividade do NHE é pelo acúmulo de Na^+ no citoplasma. Quando $[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_o$, a atividade do NHE é inibida [Grinstein et al 1989].

Um efeito similar tem sido observado usando amiloride, um inibidor do NHE. A substituição de Na^+ por Li^+ na perfusão da solução também aumenta o microclima Li^+ pode substituir o Na^+ na NHE mas não na Na^+/K^+ ATPase na membrana basolateral [Grinstein et al. 1989]. O acúmulo de Li^+ no enterócito favorece a diminuição da troca de H^+ [Shimada e Oshi 1987, 1988]. Concluindo, um MA adjacente a BBM onde o pH é mantido significativamente mais baixo do que o pH do conteúdo luminal. Este MA é gerado pela atividade da NHE e o H^+ é mantido fechado na BBM pela capa UWL/muco.

5) A Membrana em Borda de Escova (BBM)

No modelo fluido em mosaico das membranas, lipídeos estão organizados na forma de uma bicamada suportando proteínas periféricas e integrais [Singer e Nicholson 1972]. Este modelo considera a dupla camada lipídica como um fluido bidimensional no qual lipídeos e proteínas estão livres para difusão. Neste modelo lipídeos e proteínas estão distribuídos ao acaso. A fase lipídica expõe propriedades de volume em termos de fluidez (um líquido fluido isotrópico pode ser definido como $1/(F/u)$ onde F é força para manter uma velocidade u na unidade de área) [Schacter 1984]). Entretanto, a organização da membrana é mais complexa do que isto:

lipídeos e proteínas estão distribuídas transversalmente e assimetricamente, no qual a maioria das proteínas da membranas não estão livres para difusão [Op den Kamp 1979]. Isto é presumidamente devido a união dos componentes do citoesqueleto [Aszalos et al 1986]. A movimentação lateral dos lipídeos dependem da sua estrutura química e estado físico, e da sua interação lipídeo/colesterol e lipídeo/proteína [Anchordoguy et al. 1990].

Entre os lipídeos formadores de membrana, glicerofosfolipídeos quantitativamente são os mais proeminentes, seguidos por esteróis, esfingolipídeos, glicoglicerolipídeos. Os lipídeos contribuem para a compartimentalização das células e interagem com enzimas da membrana, influenciando por isso suas atividades. Lipídeos e seus produtos de degradação podem funcionar como mensageiros secundários na transmissão do sinal através das membranas plasmáticas [Daum 1990]. A composição da membrana lipídica é regulada pelo tamanho, e tecidos que têm funções similares frequentemente tem uma composição lipídica similar [White 1973]. Lipídeos específicos podem ser requeridos para atividade enzimática, interagindo diretamente com proteína ou preparando um estado físico requerido (i. e. “fluidez”) em um microclima favorecendo a estrutura terciária enzimática ótima. Certos lipídeos (como fosfatidilinositol e esfingolipídeos) participam de um processo de sinalização transmembrana [Singer 1974], e controlam a composição da membrana lipídica por ser necessário proteger a membrana ou adaptá-la as mudanças do meio.

O epitélio é composto por células polarizadas cuja membrana plasmática é separada em duas partes: a membrana basal e a membrana apical. No intestino, estas duas principais membranas, a BBM e a membrana basolateral, diferem em morfologia, processo de transporte, permeabilidade iônica, distribuição de glicolipídeos e proteínas, e a sensibilidade para hormônios e drogas [Spiegel et al 1988].

Inequivocamente, a composição da BBM e da membrana basolateral são diferentes. Esta diferente composição provavelmente está relacionada com a

diferente função destas membranas Enquanto a BBM é continuamente transposta do exterior para o interior, em uma função absorptiva, a membrana basolateral é transposta do interior para o exterior em uma função excretora

6) Proteína Citoplasmática Carreadoras de Ácido Graxo

Há duas proteínas carreadoras no citosol do intestino, uma específica do intestino (I-FABP_c), e uma no qual está também presente no fígado (L-FABP_c).

A L-FABP_c e I-FABP_c são proteínas comuns no enterócito e o padrão de distribuição delas corresponde à localização anatômica de absorção de gordura [Iseki e Kondo1990]. A concentração de L-FABP_c é duas vezes mais elevado no jejuno do rato do que no íleo, ao passo que a concentração de I-FABP_c é 1.3 vezes mais elevado nos mesmos segmentos [Sweester et al. 1988]. O enterócito é a única célula que expressa ambas as formas da FABP_c e a razão disto é desconhecida [Kaikaus et al. 1990].

As FABP_c pertencem uma família genética no qual pelo menos oito membros foram identificados e caracterizados [Kaikaus et al. 1990]. Estas proteínas com peso molecular 14-15 kDa são abundantes e apresentam alta especificidade tecidual. Elas estão presentes em tecidos que são sujeitos a grandes fluxos de ácidos graxos, ou aqueles no qual tem alta demanda de ácido graxo como substrato energético(como fígado, intestinos, coração e adipócitos) [Veerkamp et al. 1991]. À parte do seu papel no metabolismo lipídico, curiosamente a FABP_c e o NHE podem estar envolvidos na proliferação celular e a FABP_c pode estar indiretamente envolvido na regulação do crescimento e/ou diferenciação do enterócito [Ockner 1990]. Os seguintes estudos dão evidências para confirmar esta hipótese:

- 1) L-FABP_c pode transportar diferentes espécies de carcinógenos, e é a principal proteína alvo do carcinógeno hepático N-(2-fluorenyl)-acetamida (2-acetaaminofluorene) em fígado de rato [Cooper et al. 1989];

2) L-FABP_c está marcadamente aumentada durante a mitose e a regeneração em fígados normais, assim como durante a proliferação neoplásica [Cooper et al. 1989];

3) L-FABP_c liga-se com alta afinidade as prostaglandinas e leucotrienos [Khan e Sorof 1990];

4) A modulação de ácido graxo livre e acil-CoA pela L-FABP_c pode também ser importante por causa suas ativações da proteína quinase C no qual atua em um papel vital na tradução do sinal de muitos fatores de crescimento [Khan e Sorof 1990];;

5) L-FABP_c mostrou ter 84% de sequência homóloga com o inibidor de crescimento de derivado mamário (MDGI), um peptídeo regulador de crescimento no qual o papel específico é interromper o crescimento de células epiteliais mamárias quando elas tornam-se acometidas pela diferenciação na glândula mamária [Khan e Sorof 1990];

6) Especificamente no intestino, a L-FABP_c não é expressado nas proliferativas células da cripta, e somente aparece sob condições especiais como por exemplo durante a inanição, no qual está claramente associado com atrofia intestinal [Iseki et al. 1990].

O intestino também mantém um gradiente de expressão da L-FABP_c ao longo do eixo vilo-cripta sendo a L-FABP_c confinada à células absortivas do vilo. [Isek et al. 1989, 1990]. O jejuno proximal e a extremidade do vilo intestinal estão expostas a maiores quantidades de gorduras de dieta do que o íleo e as criptas, respectivamente. Assim, há gradientes - "horizontal" (proximal para distal) e "vertical" (vilo para cripta, de acordo com a terminologia de Sweestser et al. 1988) - expressando a L-FABP_c e a I-FABP_c ao longo do eixo cripto-vilo e ao longo de todo intestino. A L-FABP_c, imunorreativamente está presente na célula epitelial absortiva do vilo mas não na cripta [Sweetser et al. 1988]. A L-FABP_c está também localizada mais acima do que na porção mais baixa do eixo cripta-vilo [Iseki e Kondo]. Este

gradiente proximal-distal na concentração de L-FABP_c está desenvolvido pelo 17º dia fetal no camundongo [Sweetser et al. 1988]. O I-FABP_c e o L-FABP_c estão presentes no 18º dia de gestação do rato [Rubin et al. 1989]. Entre os dias 15 e 17 da gestação, mRNA L-FABP_c aumenta 30 vezes no intestino, atingindo o pico durante o segundo dia pós-natal [Hauft et al. 1989], o mRNA L-FABP_c no fígado aumenta 8 vezes neste intervalo. No intestino delgado de ratos mRNAs para L- e I-FABP_c são detectados em torno do 19º e 20º dia de idade fetal, e aumentam 3-4 vezes durante o primeiro dia pós-natal. Durante o crescimento de 120 para 400 gm no rato, há um aumento da mRNA L-FABP_c no fígado e no intestino, e do mRNA I-FABP_c no intestino [Gordon et al. 1985].

O jejum aumenta a concentração relativa da L-FABP_c no intestino proximal do rato, e amplia sua distribuição para as criptas [Iseki et al. 1990]. A concentração de L- e I- FABP_c no intestino e mRNA I-FABP_c é similar em ratos machos e fêmeas.

Principais características da I-FABP_c e da L-FABP_c

Características	I-Fabp _c	L-Fabp _c
Estoquiometria	1	2 ou 3
Sítio de união dos ácidos graxos	Interior	Perto da superfície
Dissociação AG/Proteína	Insensível ao pH	Sensível ao pH
Alteração conformacional devida ao pH	Insensível ao pH	Sensível ao pH
Transporta FAH	Sim	Não
Especificidade	AG	Substâncias anfipáticas

As principais características da I- e L-FABP_c estão resumidas na tabela acima [Cistola et al. 1990].

A estequiometria, posição do sítio de ligação carboxilado e a sensibilidade ao pH são as principais diferenças entre as duas proteínas [Cistola 1990].

Sugeriu-se que a L-FABP_c une e transporta uma ampla variedade de substâncias, como monoacilgliceróis, lisofosfolipídeos, sais biliares e fatores de crescimento, enquanto a I-FABP_c exclusivamente transporta ácidos graxos [Cistola 1990, Nemezc et al. 1991]. Derivados da Acil-CoA ligam-se a L-FABP_c com menor afinidade quando comparados com ácidos graxos de cadeia longa, e os sítios de ligação da Acil-CoA podem estar separados do sítio(s) de ligação dos ácidos graxos de cadeia longa. Outros lipídeos que ligam-se a L-FABP_c incluem lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina e monogliceróis, prostaglandinas E₁ e metabólitos do ácido araquidônico (15-HPETE e 5-HETE). Prostaglandinas e leucotrienos têm sido implicados na modulação do crescimento celular e também ligam-se a L-FABP_c com alta afinidade [Raza et al. 1989].

O conteúdo de L-FABP_c, do fígado e intestino delgado, aumentam modestamente a resposta a uma dieta alta em gordura; há um aumento em 30% na L-FABP_c no jejuno e um aumento de 50% no íleo; resultando na perda do gradiente "horizontal". Em resposta a um conteúdo de gordura, a I-FABP_c aumenta somente no íleo [Ockner e Manning 1974].

Dietas pobres em gordura resultam em declínio de ambos os níveis de L- e I-FABP_c no intestino delgado proximal [Ockner e Manning 1974]. Baseado nestas observações vários autores sugerem que L- e I-FABP_c desempenham um importante papel na regulação da absorção de lipídeos [Clark e Armstrong 1989].

Sequência completa de nucleotídeos tem sido estabelecidos para L-FABP_c [Sweetser et al. 1988], I-FABP_c do rato [Ropson et al. 1990], I-FABP_c humana [Sweetser et al. 1988], proteína carreadora de retinol intestinal no rato, FABP de adipócitos de camundongos, FABP_c de coração humano [Boerchers et al. 1990], e CRBP-I humano [Nilsson et al. 1988]. I-FABP_c de rato já teve sua estrutura expressa em *E. coli* e as suas propriedades físicas relativas aos ácidos graxos tem sido definidas [Sachettini et al. 1990]. O gene da FABP intestinal do rato foi definido

[Sweetser et al. 1988; Green et al 1992], e a organização destes genes parece ser idêntica com 4,400-4,000 nucleotídeos, quatro exons e três introns. Tem sido proposto que o gene FABP intestinal resulta de uma duplicação intragênica [Gordon e Lowe 1985]. Os genes codificando a I-FABP_c e a FABP adipócito estão no mesmo cromossomo do camundongo [Sweetser et al 1988; Green et al. 1992]. A sequência do código do cDNA para a L-FABP_c e I-FABP_c já foram expressas em E. coli. O mRNA I-FABP_c está limitado ao intestino delgado e grosso de humanos, ratos e macacos [Sweetser et al. 1988]. No camundongo o nível de I-FABP_c mRNA no íleo é 75% daquela no jejuno distal e é muito baixo no colon e no ceco [Sweetser et al. 1988]. O mRNA L-FABP_c de rato é achado em altas concentrações no fígado e no intestino { 0.7 e 2.1% do total de mRNA, respectivamente}; o mRNA I-FABP_c representa aproximadamente 1% do total de mRNA do intestino delgado do rato [Bass et al. 1985].

7) Absorção Passiva de Lipídeos

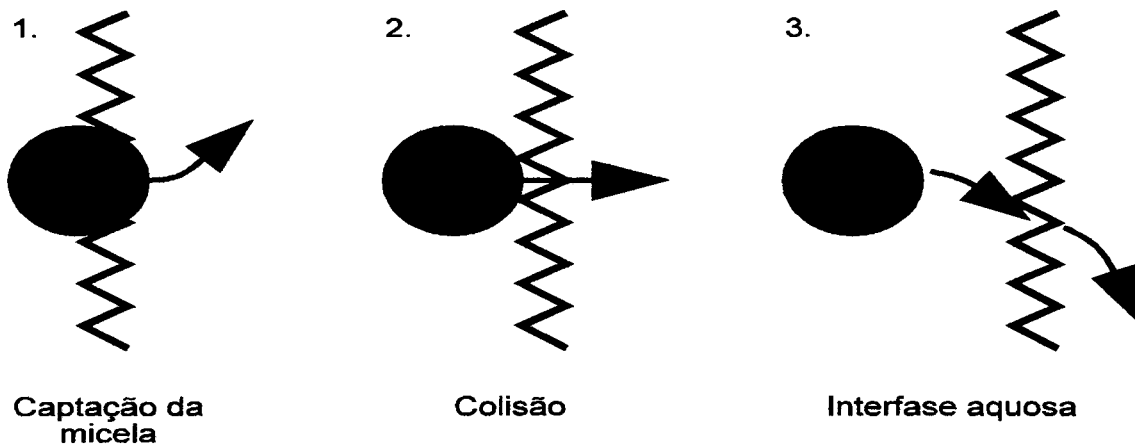
7.1) Dissociação de micelas compostas no lúmen intestinal

Ácidos biliares e fosfolipídeos associados a lipídeos formam micelas na fase aquosa do lúmen intestinal [Small 1970, Carey e Small 1970, revisado em Thomson e Dietschy 1981 e Shiau 1987]. Ácidos biliares e fosfolipídeos são secretados pelo fígado e entram no intestino através do trato biliar. A maioria dos ácidos biliares são conjugados da taurina ou glicina com ácidos chólico e chenodeoxychólico [revisado em Thomson e Dietschy 1981 e em Shiau 1987]. Ácidos biliares, ácidos graxos livres, monoacilglicerol e outros produtos da digestão lipídicas existem como monômeros em baixa concentração. Quando uma concentração crítica de ácidos biliares é alcançada, eles começam a formar agregados conhecido como micelas [Carey e Small 1970, Small 1970]. Quando a micela contém somente uma espécie de lipídeos é designado uma micela simples; quando contém mais do que uma espécie de lipídeo, é designado micela composta. Micelas compostas é a forma no qual os produtos altamente hidrofóbicos da digestão lipídica como monoglicérides, ácidos graxos de cadeia longa e colesterol, são transportados no meio aquoso

intestinal [Carey e Small 1970, Carey et al. 1983]. Uma vez formado, as moléculas constituintes da micela composta estão em um rápido equilíbrio dinâmico com as moléculas livres na solução. Na presença de micelas compostas a concentração aquosa de ácidos biliares permanece relativamente constante [Carey e Small 1970, Small 1970, Salee 1974]. A concentração no qual um lipídeo forma micelas é a concentração micelar crítica (CMC) e a CMC depende da composição da micela composta, temperatura, composição iônica e o pH da solução [Carey e Small 1970, Revisado em Shiau 1987]. Temperaturas e pH baixos podem aumentar significativamente a CMC [Carey e Small 1970, Small 1970]. Ácidos biliares são reabsorvidos passivamente pelo intestino e são reciclados através da circulação enterohepática. Ácidos biliares são absorvidos passivamente no intestino proximal, visto que o íleo tem mecanismos de transporte ativo para recuperar o ácido biliar e para a prevenção de perda de grandes quantidades de ácido biliar no cólon onde eles têm efeito catártico. Quantitativamente, o íleo terminal é o maior sítio de reabsorção de ácido biliar em humanos e mas a contribuição do jejuno e a absorção passiva são significantes. A difusão passiva é aumentada pela protonação de ácidos biliares, por diminuir o número de seus grupos hidroxilas e por sua desconjugação. a formação de micelas compostas versus micelas simples também reduz a difusão passiva do ácido biliar. O sistema de transporte ileal *in vivo* no rato é de baixa afinidade e alta capacidade para conjugações taurina de ácidos biliares hidrofílicos.

Três diferentes modelos tem sido propostos para a absorção de lipídeos da micela [Revisado em Thomson e Dietschy 1981] (figura A). No primeiro modelo, a micela inteira é transportada através da BBM. Nenhuma evidência experimental confirma este modelo. No segundo modelo, lipídeos são transportados diretamente das micelas por colisão entre a micela e a BBM. Em alguns sistemas experimentais, isto parece ser o modelo de absorção de colesterol mas não para ácidos graxos de cadeia longa, e a importância deste sistema pode depender da composição da micela. O terceiro modelo envolve a dissociação de lipídeos em compartimento aquoso.

Fig. A: Diferentes modelos para a absorção de lipídeos da micela



Evidências experimentais para a confirmação do terceiro modelo foram proporcionados por Westergaarden e Dietschy [1976].

Estes autores estudaram a absorção de diferentes concentrações de colesterol e ácidos graxos *in vitro* em jejuno de coelho na presença de diferentes concentrações de ácidos biliares. Se o primeiro e o segundo modelo de absorção lipídica da micela estiverem corretos, a absorção lipídica aumentaria proporcionalmente ao número de micelas na solução. Se o terceiro modelo fosse correto, aumentando o número de micelas diminuiria a absorção lipídica favorecendo a partição de ácidos graxos dentro da micela [Westgaard e Dietschy 1976]. Quando se aumentava a concentração de ácidos biliares mantendo a concentração de ácido graxo constante, havia uma diminuição na absorção lipídica, sugerindo a existência de um compartimento aquoso intermediário [Westgaar e Dietschy 1976]. Em recente estudo usando vesículas da BBM de coelhos, Proulx et al. [1984] demonstraram que a absorção de colesterol aumentava linearmente com a concentração de ácidos biliares , sugerindo um modelo de colisão para a absorção de colesterol. Este

mesmo achado foi recentemente confirmado em estudos onde observou-se na absorção de colesterol por vesículas da BBM de coelho, quando se aumentava a concentração de taurocolato de sódio [Burdick et al. 1993]. O uso das vesículas da BBM para testar a absorção lipídica, é entretanto, limitada pela eventual ausência da UWL. Uma modificação no modelo de Westgaard de absorção de lipídeos é o modelo proposto por Shiau et al. Neste modelo, as micelas entram em um MA, onde se dissociam rapidamente por esse meio aumentando a eficácia da absorção lipídica [Shiau 1987, 1990]. Neste modelo, a absorção de ácido graxo depende da quantidade de ácido graxo liberado no microclima. Monômeros e micelas contribuem para liberar o ácido graxo dentro do microclima. Desde que a concentração monomérica é limitada, o número de micelas e a quantidade de ácido graxo transportado pela micela composta são os maiores determinantes para a absorção de ácidos graxos [Shiau 1987, 1990].

Este mesmo autor, usando sacos intestinais de coelho evertido, demonstrou que aumentando o pH do MA havia uma diminuição na absorção lipídica [Shiau 1990]. A relação entre ácido graxo e micela composta na presença de um MA pode ser entendida em relação as propriedades físicas dos ácidos graxos. Ácidos graxos são moléculas fortemente lipofílicas e fracamente hidrofílicas [Small 1970]. Em solução, ácidos graxos existem como misturas de espécies carregadas e não-carregadas. A proporção relativa das duas formas pode ser dado pela equação de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH}=\text{pK} + \log\left(\frac{[\text{FA}^-]}{[\text{FAH}]}\right)$$

onde pK é o pH no qual metade da ionização está completa, e FA⁻ e FAH são quantidades relativas de sal e ácido respectivamente [Small et al. 1984]. O pK do grupo carboxila do ácido graxo depende do meio [Small et al. 1984]. No meio aquoso o pK do ácido graxo é aproximadamente 4.8 (isto é, em um pH 4.8, a quantidade de FA⁻ e FAH é aproximadamente a mesma). No meio lipídico como o de uma micela composta, o pK do ácido graxo é aproximadamente 7 [Small et al. 1984]. No pH neutro da fase aquosa do intestino, os ácidos graxos solubilizados nas micelas

compostas apresentam aproximadamente a mesma proporção de FA⁻ e FAH. Isto facilita a solubilização dos ácidos graxos no meio aquoso intestinal [Small 1970]. As propriedades físicas do muco intestinal conferem ao intestino a habilidade de manter um pH relativamente baixo próximo a BBM, quando comparados com a fase luminal. Esta região, denominada de MA, pode ser de grande importância na absorção lipídica. Nela os ácidos graxos solubilizados na micela composta ficam protonados facilitando com isso sua dissociação [Small 1970, Shiau 1990, Shiau e Levine 1980, Shiau et al. 1990]. Os ácidos graxos livres no MA tornam-se protonados no que aumenta a hidrofobicidade e a liposolubilidade destas, por assim facilitando sua partição dentro da BBM.

7.2) Adsorção e penetração dos lipídeos no folheto externo da BBM

A adsorção do folheto externo da BBM depende sobretudo da interrelação das propriedades físicas do soluto (neste caso, lipídeos de dieta lipídica) e das do solvente (neste caso, a BBM). Estudos físico-químicos de alguns anos atrás sugerem que entre todas as membranas com dupla camada lipídica, a BBM pode ser uma das mais impermeáveis [Patton 1986]. A distribuição assimétrica dos fosfolipídeos na BBM parece ser a razão desta relativa impermeabilidade. Na BBM, os esfingolipídeos estão presentes principalmente no folheto externo e podem trazer alguns problemas adicionais para a penetração lipídica passiva [Patton 1986, Dudeja et al. 1991]. Esfingolipídeos tendem a ficar muito unidos das moléculas de colesterol, servirem em como “espaçadores”, estes não parecem expandir a área média por molécula de esfingolipídeo [Paton 1986]. Meddings [1988] demonstrou uma correlação significativa entre as propriedades físicas do folheto externo BBM, e a absorção lipídica da BBM. Naquele estudo, foi mostrado que o jejuno, no qual é exposto a maioria da dieta lipídica, tem uma alta fluidez no terço externo da BBM. O íleo, por outro lado, menos exposto à dieta lipídica, tem uma alta rigidez no terço externo do folheto da BBM. Este estudo demonstrou que também ácidos graxos podem modificar as propriedades físicas da região externa da BBM. A velocidade da penetração de lipídeos através da BBM depende sobretudo das propriedades físicas da BBM e como resultado, um dos fatores limitantes na penetração de ácido graxo

pode estar localizado no terço externo da BBM [Meddings 1988]. Ambas as formas de ácidos graxos, FA^- e FAH podem penetrar a BBM. Desde que a BBM age como um solvente para ácidos graxos é necessário considerar a ligação de ambas formas, carregadas e não-carregadas de ácidos graxos à BBM, e considerar a possibilidade que a ligação destas formas (FA^- e FAH) pode ser diferente. Por exemplo, a captação de formas não-carregadas (FAH) por lipossomas é 100 vezes maior do que de formas carregadas (FA^-). Esta diferença pode ser atribuída a maior penetração da FAH dentro da dupla camada lipídica com um consequente aumento na interação hidrofóbica. Como resultado do aumento do pK, a carga da superfície e o potencial de membrana da superfície aumentam. A concentração de FAH próximo à superfície será igual a concentração da fase de volume, mas a concentração de FA^- será menor do que a concentração de FA^- na fase de volume, por que a ligação da forma FA^- resulta em corpo negativo perto da membrana a qual reduz ainda mais a ligação de FA^- . Desde que o folheto externo da BBM é exposto ao pH baixo do microclima, os ácidos graxos adsorvidos à membrana permanecem na forma protonada. [Small et al. 1984]. A importância do pH na absorção lipídica foi também demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*. Stremmel et al. [1986], demonstrou que a ligação de ácido oleico à vesículas da BBM de ratos era profundamente influenciado pelo pH. A ligação de ácido oleico alcançou um máximo no pH 4. Em pH 4,0, o pré-tratamento das vesículas com tripsina não mudaram significativamente a captação de ácido oleico, quando comparado com vesículas íntegras. Em pH 8, entretanto, a tripsina reduzia esta ligação em 80%. Este achado sugere a possibilidade que em pH baixo, ácido oleico não-ionizado liga-se preferencialmente à membrana lipídica em um processo passivo [Stremmel et al. 1986].

Em outro estudo, o pH da superfície intestinal foi medido em biópsias intestinais de pacientes com espru tropical ativo, espru tropical em remissão, e indivíduos saudáveis como controle [Lucas 1989]. O pH da superfície foi significativamente mais alto em pacientes com espru tropical ativo (6.0 ± 0.08) do que em pacientes com espru tropical em remissão e indivíduos saudáveis do grupo controle (5.75 ± 0.06). Este pH anormalmente alto correlacionou-se diretamente com

aumento na excreção de gordura fecal, sugerindo a importância do pH baixo na superfície intestinal para a absorção lipídica [Lucas 1989], demonstrando *in vivo* a importância do microclima ácido na absorção lipídica.

7.3) Equilíbrio com o folheto interno da membrana

Em ordem para serem levados pelos solubilizadores citoplasmáticos, o ácido graxo deve equilibrar com o folheto interno da BBM [Shiau 1987]. O equilíbrio com o folheto interno pode ser vagaroso para algumas classes de lipídeos, e isto pode ser um fator de velocidade limitante para a absorção de lipídeos [Devaux 1991]. O equilíbrio de ácidos graxos livres nos dois folhetos da membrana depende sobretudo das propriedades físicas da membrana e dos ácidos graxos. Membranas mais fluidas permitem equilíbrio mais rápido [Devaux 1991]. O conteúdo de colesterol e proteínas das membranas afetam indiretamente o movimento transmembrana de lipídeos por alterar sua fluidez [Schachter 1984]. A natureza e a carga da cabeça polar dos lipídeos também são importantes no movimento transmembrana. Biomembranas permitem passagem rápida de lipídeos não-carregados.

A dupla camada lipídica tem alta permeabilidade para H^+ quando comparado com outros íons do mesmo tamanho. A presença de ácidos graxos na BBM pode aumentar a permeabilidade desta membrana para H^+ [Schonfeld et al. 1989]. O mecanismo envolvido neste aumento da permeabilidade para H^+ é controverso [Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. É importante salientar que ácidos graxos tem em um pK de 4.8 em solução aquosa e aproximadamente 7.5 na membrana, podendo assim agir como um simples carreador de próton [Gutknecht 1987,1988]. Os folhetos internos e externos da BBM são expostos a diferentes pH. O folheto externo está exposto ao pH ácido do MA [Lucas et al. 1975; Said et al. 1987; Shimada e Oshi 1988; Shimada 1987]. O folheto interno da BBM está exposto ao pH neutro do citoplasma do enterócito. Uma vez adsorvido no folheto externo, ácidos graxos protonados tendem a equilibrar-se rapidamente com o folheto interno. Nos lipossomas, a velocidade de equilíbrio induzido pelo pH baixo é extremamente rápida (milissegundos). Uma vez no folheto interno, ácidos graxos são expostos ao

pH neutro do citoplasma do enterócito e a desprotonação deve ocorrer. Como resultado da desprotonação do grupo carboxila, um potencial de superfície é gerado, no qual reduz o pH próximo ao folheto interno quando comparado com o citoplasma. A desprotonação do ácido graxo pode também contribuir para prevenção da difusão retrógrada do ácido graxo. Este efeito depende da densidade da carga da superfície da membrana e da força iônica do citoplasma [Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. O H^+ transportado pelo ácido graxo durante a penetração pode então ser expulso pelo NHE na troca por Na^+ .

Os níveis normais de ácido graxo livre na membrana variam de < 1 mol a 40 mol% do total de lipídeos, dependendo do tipo específico da membrana celular e suas condições metabólicas. O conteúdo de ácidos graxos da BBM atinge de 5 a 15 mol % [Dudeja et al. 1991]. Este conteúdo pode ser alterado durante o processo de absorção quando a BBM é transposta pelos ácidos graxos livres [Meddings 1988].

Ao transpor membranas biológicas, os ácidos graxos podem transportar H^+ , agindo assim como agentes protonofóricos [Gutknetch 1987, 1988, Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. As propriedades protonofóricas dos ácidos graxos podem ser inibidas pela albumina sérica, floretina e pH baixo [Gutknetch 1987,1988; Perkins e Cafiso 1987a 1987b] . O (s) mecanismo (s) envolvendo esta inibição não é totalmente claro. Albumina sérica é bem conhecida por sua habilidade de reverter ligações de moléculas anfifílicas [Cistola et al. 1989]. Albumina sérica pode portanto agir extraíndo ácido graxo livre da membrana, e assim diminuir a condutância do H^+ [Gutknetch 1988]. O efeito da floretina é comparável ao de albumina sérica, mas o mecanismo é provavelmente diferente e mais complexo. O efeito primário da floretina na dupla camada lipídica é diminuir o potencial dipolo da membrana [Perkins e Cafiso 1987a, 1987b]. As forças elétricas da BBM são de fundamental importância para o processo de transporte iônico e de conformação protéica na membrana [Perkins e Cafiso 1987a]. Uma das maiores forças elétricas dos íons que atravessam a membrana são submetidas àquelas resultantes do potencial dipolo da membrana [Perkins e Cafiso 1987a]. Nas vesículas de fosfatidilcolina a magnitude

do potencial dipolo é 200 a 300 mV (interior negativo). A base molecular do potencial dipolo é desconhecida. O efeito deste potencial dipolo na configuração das proteínas é desconhecido, mas é provável ser um importante elemento na determinação desta configuração protéica. O efeito da floretina na redução do potencial dipolo da membrana esta diretamente envolvido com o decréscimo na condutância de H^+ causado pelo ácido graxo na membrana lipídica [Perkins e Cafiso 1987a].

O potencial de membrana do enterócito pode ser também importante em determinar a absorção lipídica. As cargas negativas no citoplasma do enterócito podem repelir formas FA^- do ácido graxo, além disso diminuir a velocidade de equilíbrio com o folheto interno [Gutknetch 1987]. Anfotericina-B, um antibiótico poliênico formado de poros, que aumenta a permeabilidade catiônica e hiperpolariza a BBM, produz um significativo aumento na permeabilidade de H^+ em vesículas unilamelares [Gutknetch 1987]. Na mucosa colônica distal do coelho, a adição de anfotericina-B aumenta a absorção de lipídeos. No mesmo sistema, baixando-se a diferença de potencial diminui-se a absorção lipídica, enquanto aumentando-se a diferença de potencial aumenta-se a absorção lipídica. Os autores concluem que o movimento de ácidos graxos através destas membranas devem estar associados com o movimento simultâneo de cargas positivas.

Em culturas de células com leucemia mielóide humana, foi demonstrado que a presença de albumina significativamente reduz a absorção de ácido graxo. Além disso, na presença de albumina, a absorção de ácidos graxos é um processo muito lento e segue um curso linear entre 3 e 60 minutos. Na presença de albumina, a translocação de ácido graxo para dentro do folheto interno e a subsequente utilização para processo metabólico torna-se também um processo muito lento.

Concluindo-se, as forças elétricas que agem na BBM e o potencial dipolo da membrana parecem ser fatores importantes na determinação do equilíbrio de ácidos graxos com o folheto interno da BBM [Gutknetch 1987]. Substâncias as quais diminuem o potencial dipolo da membrana, como o floretina, estão associadas com

uma inibição na absorção lipídica enquanto substâncias as quais aumentem a diferença de potencial da membrana estão associados a uma maior absorção lipídica, tanto em membranas artificiais quanto em membranas naturais [Perkins e Cafiso 1987a, 1987b, Gutknecht 1987]. Além disso, as propriedades protonofóricas dos ácidos graxos podem ser um importante passo na absorção lipídica através da BBM.

7.4) Absorção pela FABP_c

Uma vez transposta a BBM, lipídeos devem ser ligados e transportados no meio aquoso do citoplasma do enterócito por um tipo de proteína intracelular conhecida como proteína citoplasmática carreadora de ácidos graxos (FABP_c). Como mencionado antes (seção 5), os enterócitos contêm dois tipos de proteínas carreadoras de ácidos graxos, uma específica para o intestino (I-FABP_c), e uma que está também presente no fígado (L-FABP_c).

Permanece incerto como lipídeos que atravessam a BBM do lúmen intestinal são retirados do folheto interno da BBM. Sabe-se, porém que a I-FABP_c pode unir lipídeos em pH baixo e é mais específico para ácidos graxos [Cistola et al. 1989, 1990]. Estas importantes características da I-FABP_c podem facilitar a ligação e o transporte de ácidos graxos protonados [Cistola et al. 1989]. Formas protonadas de ácidos graxos podem ser transportadas pela I-FABP_c e formas não-protonadas pela L-FABP_c [Cistola et al. 1989]. Resumindo, transportar ácidos graxos é notavelmente insensível ao pH.

8) Absorção lipídica mediada por proteína

Outro caminho pelo qual os ácidos graxos podem ser transportados através da BBM é por meio de uma proteína carreadora de ácidos graxos da membrana plasmática (FABP_{pm}). A presença da FABP_{pm} foi sugerida por que a absorção de ácido oleico pelos enterócitos 1) é tempo-, temperatura-, e pH-dependente; 2) pode ser reversivelmente inibido por incubação na presença de excesso de oleato não

marcado pelo enterócito, e 3) pode ser reduzida pela desnaturação trípica das proteínas da BBM [Stremmel et al 1986].

A FABP_{pm} é um proteína que liga com alta afinidade baixas concentrações de ácidos graxos de cadeia longa [Stremmel et al. 1986; Stremmel 1988]. A FABP_{pm} tem sido isolada de uma variedade de tecidos, incluindo o intestino, fígado; coração e adipócitos. A FABP_{pm} tem um peso molecular de aproximadamente 40 kDa, não contém carboidratos e tem um pI de aproximadamente 9 [Stremmel et al. 1986, Stremell 1988]. A FABP_{pm} é diferente da FABP_c [Veerkamp et al. 1991]. Elas estão localizadas nas moléculas extrínsecas da superfície externa da membrana celular, como mostrado por suas extratibilidades com soluções salinas, sua inibição pela digestão trípica e suas reações com moléculas específicas dentro da porção lipofílica da membrana. A FABP_{pm} age como um receptor de ácidos graxos de cadeia longa e possivelmente também como uma translocase. Imunologicamente proteínas similares tem sido purificadas de membranas plasmáticas do fígado, jejuno, miócitos cardíacos e adipócitos [Stremell 1988].

A FABP_{pm} tem alta afinidade pelo ácido graxo e o cálculo V_{max} e k_m da FABP_{pm} em enterócitos de rato foi 2.1 nmol/min e 93 nM, respectivamente [Stremmel 1988]. Estudos imunológicos mostram que ele está localizado no topo das criptas do jejuno e íleo mas não em esôfago, estômago e cólon. Estudos sugerem que a FABP_{pm} é importante na captação de baixas concentrações de lipídeos.

A real importância desta proteína na absorção de ácidos graxos pelo enterócito está ainda por ser estabelecida.

9) Conclusão

A absorção de ácidos graxos pela membrana do enterócito, apesar de ser um passo extremamente importante para o metabolismo destes, ainda não é totalmente entendida. O antigo conceito de absorção passiva de ácidos graxos evoluiu para um modelo muito mais complexo onde participam pelo menos duas proteínas da BBM.

A presença de um sistema proteico capaz de absorver ativamente ácidos graxos e a cooperação da enzima NHE, modulando as propriedades físicas dos ácidos graxos, influenciando, portanto, diretamente o coeficiente de permeabilidade pasiva dos ácidos graxos e as propriedades de solvente da BBM trazem à baila uma interessante perspectiva: a possibilidade de modulação da absorção de ácidos graxos com o uso de drogas. Estas drogas, poderiam beneficiar um grande número de pessoas, sofrendo de diferentes doenças, como por exemplo, Diabetes Melitus, dislipidemias, obesidade mórbida, etc. Da mesma maneira, drogas que estimulassem a atividade destas enzimas poderão ter utilidade clínica para estimular a absorção de gorduras sempre que esta for necessária.

9) REFERÊNCIAS

- Acra S, Dykes W, Nylander W, Gishan FK. Characterization of a distinct Na^+/H^+ exchanger in the basolateral membrane of the human jejunum. **Gastroenterology**. 1991;100:A678.
- Allen A: Structure and function of gastrointestinal mucus. *In* Physiology of Gastrointestinal Tract. Edited by Leonard R. Johnson. Raven Press, New York. 1981 . 617-639.
- Aronson P. Kinetic properties of the plasma membrane Na^+-H^+ exchanger. **Ann Rev Physiol**. 1985;47:545-560.
- Aszalos A, Damjanovich S, Gottesman MM. Depolymerization of microtubules alters membrane potential and affects the motional freedom of membrane proteins. **Biochem** 1986;25:5804-5809.

- Boerchers T, Hojrup P, Nielsen SU, Roesptorff P, Spener F , Knudsen J. Revision of the amino acid sequence of human heart fatty acid-binding protein. **Mol Cell Biochem.** 1990;98:127-133.
- Borgstrom B, Dahlqvist A, Lund G, Sjovall J. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. **J Clin Invest.** 1957;36:1521-1536.
- Borgstrom B. Digestion and absorption of lipids. **Rev Physiol.** 1977;12:305-323.
- Brodie B, Adrian C , Hogben AM. Some physico-chemical factors in drug action. **J Pharm Pharmacol.** 1957;9:345-388.
- Carey MC, Small DM. The characteristics of mixed micellar solution with particular reference to bile. **Am J Med** 1970;49:590-608.
- Carey MC, Small DM, Bliss CM. Lipid digestion and absorption. **Annu Rev Physiol** 1983;45:651-677.
- Cistola DP, Sacchettini JC, Banaszak LJ, Walsh MT, Gordon JI. Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative ¹³C NMR study. **J Biol Chem.** 1989;264:2700-2710.
- Cooper RB, Noy N , Zakin D: Mechanism for binding of fatty acids to hepatocyte plasma membrane. **J Lip Res.** 1989;30:1719-1726.
- Daum G. Assembly of lipids into membranes. **Experientia.** 1990;46:551-552.

- Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. **Biochem.** 1991; 20:1163-1173.
- Diamond J. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. **NIPS.** 1991;6:92-96.
- Dietschy JM, Sallee VL, Wilson FA. Unstirred water layers and absorption across the intestinal mucosa. **Gastroenterology.** 1971;61:932-934.
- Dudeja PK, Wali RK, Klitzke A, Sitrin MD , Brasitus TA. Correction of Enhanced Na⁺/H⁺ exchange of rat small intestinal brush-border membranes in streptozotocin-induced diabetes by insulin or 1,25-dihydroxycholecalciferol. **J Clin Invest.** 1991a; 87:1755-1762.
- Dudeja PK, Harig JM, Wali RK, Knaup SM, Ramaswamy K , Brasitus TA. Differential modulation of human small intestinal brush-border membrane hemileaflet fluidity affects leucine aminopeptidase activity and transport of D-glucose and L-glutamate. **Arch Biochem Biophys.** 1991b;284:338-345.
- Dudeja PK, Wali RK, Harig JM, Brasitus TA. Characterization and modulation of rat small intestinal brush-border membrane transbilayer fluidity. **Am J Physiol.** 1991c;260:G586-G594
- Forlong C, Tasman-Jones C, Thomsen L , Clearwater J: The Na⁺/H⁺ and H⁺ diffusion properties of human postmortem mucus: A comparison of gastric antral, gastric body, jejunal and ileal mucus. **J Clin Gastroenterol.** 1990; 12- Suppl: 110-115.

Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJ and Ladzdunski M. Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channels, Na⁺/H⁺ antiporte and Na⁺/Ca⁺⁺ exchanger. **Biochimie**. 1988; 70:1285-1290.

Gleeson D. Acid-base transport systems in gastrointestinal epithelia. **Gut**. 1992; 33:1134-1145.

Gordon JI, Lowe JB. Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. **Chem Phys Lipids**. 1985a;38:137-158.

Gordon JI, Elshourbagy N, Lowe JB, Liao S, Alpers DH, Taylor JM. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins. **J Biol Chem**. 1985b;260:1995-1998.

Gordon JI: Intestinal epithelial differentiation: New insights from chimeric , transgenic mice. **J Cell Biol**. 1989; 108:1187-1194.

Green RP Cohn SM Sacchettini JC, Jackson KE , Gordon JI: The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide, sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product. **DNA Cell Biol**. 1992; 11: 31 -41 .

Grey VL, Garofalo C, Greenberg GR , Morin CL: The adaptation of the small intestine after resection in response to free fatty acids. **Am J Clin Nutr**. 1984; 40:1235-1242.

- Grinstein S, Rothstein A. Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. **J Membrane Biol.** 1986; 90:1-12.
- Grinstein S, Goetz JD, Rothstein A. $^{22}\text{Na}^+$ fluxes in thymic lymphocytes. **J Gen Physiol.** 1984; 84:585-600.
- Grinstein S, Rotin D, Mason M: Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. **BBA.** 1989; 988: 73-97.
- Guth D, Engelhardt W. Is gastrointestinal an ion selective barrier? **Soc Exp Biol.** 1989:117-121.
- Gutknecht J. Proton conductance through phospholipid bilayers: water wires or weak acids?. **J Bioenerg Biomembr.** 1987; 19:427-442.
- Gutknecht J. Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. **J Membrane Biol.** 1988;106:83-93.
- Hogben CAM, Tocco DJ, Brodie BB, Schanker LS. On the mechanism of intestinal absorption of drugs. **J Pharmacol Exper Therap.** 1959;125:275-282.
- Iseki S, Kondo H: An immunocytochemical study on the occurrence of liver fatty acid-binding protein in the digestive organs of rats: Specific localization in the D cells and brush cells. **Acta Anat.** 1990;138: 15-23.
- Iseki S, Kondo H, Hitomi M, Ono T: Localization of liver fatty acid-binding protein and its mRNA in the liver and jejunum of rats: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Mol and Cell Biochem.** 1990; 98: 27-33.

Johnson JD and Epel D. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. **Nature**. 1976; 262:661-664.

Johnston JM. Mechanism of fat absorption. In: Handbook of Physiology. Alimentary Canal, Intestinal Absorption. Washington, DC:Am Physiol Soc 1968;sect. 6, vol III, chapter 70, pp. 1353-1375.

Kaikaus RM, Bass NM , Ockner RK : Functions of fatty acid binding proteins. **Experientia**. 1990; 46 : 6 17-630.

Karasov W , Diamond J: Adaptation of intestinal nutrient transport. in *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Second Edition. Edited By L. Johnson. Raven Press, New York, 54: 1489-1497.

Khan SH , Sorof S: Preferential binding of growth inhibitory prostaglandins by the target protein of a carcinogen. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1990; 87: 9401-9405.

Knickelbein RG, Aronson PS, Dobbins JW. Membrane distribution of Sodium-Hydrogen and Chloride-Bicarbonate exchangers in crypt and villus membranes in rabbit ileum. **J Clin Invest**. 1988;82:2158-2163.

L'Allemain G, Paris S and Pouyssegur J. Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts. Evidence for a major role of the Na⁺/H⁺ antiport. **J Biol Chem**. 1984; 259:5809-5815.

- Lucas ML, Schneider W, Haberich FJ, Blair JA. Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum. **Proc R Soc London Ser.** 1975B;192:39-48.
- Lucas ML, Blair JA, Cooper BT, Cooke WT: Relationship of the acidic microclimate in rat and human intestine to malabsorption. **Biochem Soc Trans.** 1976; 41:154-156.
- Lucas M, Swanston S, Lei F, Mangkornthong P, Blair J: Effect of ethanol, diphenylhydantoin, methotrexate and low sodium ion concentration on jejunal surface pH and folic acid transfer in the rat. **Biochem Soc Trans.** 1978; 6:297-298.
- Lucas ML, Cooper BT, Lei FH, Johnson IT, Holmes GKT, Blair JA, Cooke WT. Acid microclimate in coeliac and Crohn's disease: a model for folate malabsorption. **Gut.** 1978; 19:735-742.
- Lucas ML, Lei FH, Blair JA. The influence of buffer pH, glucose and sodium ion concentration on the acid microclimate in rat proximal jejunum in vitro. **Pflugers Arch.** 1980;385:137-142.
- Lucas ML. In: Pharmacology of Intestinal Permeation II. Csaky TZ (ed). Springer-Verlag: Tokyo, 1984;pp. 119-163.
- Lucas M: A contribution to analysis of three-compartment models for intestinal weak electrolyte absorption. **Am J Physiol.** 1984; 247-10 : G463-G467 .

Lucas ML, Schneider W, Haberich FJ, Blair JA. Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum. **Proc R Soc London Ser.** 1975B;192:39-48.

Lucas ML, Blair JA, Cooper BT, Cooke WT: Relationship of the acidic microclimate in rat and human intestine to malabsorption. **Biochem Soc Trans.** 1976; 41:154-156.

Lucas M, Swanston S, Lei F, Mangkornthong P, Blair J: Effect of ethanol, diphenylhydantoin, methotrexate and low sodium ion concentration on jejunal surface pH and folic acid transfer in the rat. **Biochem Soc Trans.** 1978; 6:297-298.

Lucas ML, Cooper BT, Lei FH, Johnson IT, Holmes GKT, Blair JA, Cooke WT. Acid microclimate in coeliac and Crohn's disease: a model for folate malabsorption. **Gut.** 1978; 19:735-742.

Lucas ML, Lei FH, Blair JA. The influence of buffer pH, glucose and sodium ion concentration on the acid microclimate in rat proximal jejunum in vitro. **Pflugers Arch.** 1980;385:137-142.

Lucas ML. In: Pharmacology of Intestinal Permeation II. Csaky TZ (ed). Springer-Verlag: Tokyo, 1984;pp. 119-163.

Lucas M: A contribution to analysis of three-compartment models for intestinal weak electrolyte absorption. **Am J Physiol.** 1984; 247-10 : G463-G467 .

Lucas ML, Mathan VI. Jejunal surface measurements in tropical sprue. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg.** 1989;83:138-142.

Madara JL, Trier JS. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Second Edition. Edited by Leonard R. Johnson. Raven Press, New York. 1987. PP 1209-1249.

Mantle M, Stewart G, Zayas G and King M. The disulphide-bond content and rheological properties of intestinal mucins from normal subjects and patients with cystic fibrosis. **Biochem J.** 1990;266:597-604.

Meddings JB. Lipid permeability of rat jejunum and ileum: correlation with physical properties of the microvillus membrane. **BBA.** 1988;943:305-314.

Meddings JB, Thiesen S. Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition. **Am J Physiol.** 1989;256:G931-G940.

Meddings JB, DeSouza D, Goel M, Thiesen S. Glucose transport and microvillus membrane physical properties along the crypt-villus axis of the rabbit. **J Clin Invest.** 1990a;85:1099-1107.

Meddings JB. Membrane function: Its relationship to intestinal absorption and malabsorption. **Can J Gastroenterol.** 1990b;4:39-46.

Nemecz G Hubbell T Jefferson JR Lowe JB , Schroeder F: Interactor of fatty acids with recombinant rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins. **Biochem Biophys.** 1991; 286: 300-309.

induced conductance changes in vesicles. **J Membrane Biol.** 1987b;96:165-173.

Proulx P. Structure-function relationships in intestinal brush border membranes. **BBA.** 1991; 1071:255-271.

Raza H, Pogubala JR, Sorof S. Specific high affinity binding of lipoxigenase metabolites of arachidonic acid by liver fatty acid binding proteins. **Biochem Biophys Res Commun.** 1989;161:448-455.

Ropson IJ, Gordon JI, Frieden C: Folding of a predominantly α -helical structure protein: rat intestinal fatty acid binding protein. **Biochemistry.** 1990;29: 9591-9599.

Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. **Science.** 1986;234:161-166.

Rubin DC, Ong DE, Gordon JI. Cellular differentiation in the emerging fetal rat small intestinal epithelium: mosaic patterns of gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1989;86:1278-1282.

Sacchettini JC, Gordon JI, Banaszak LJ. Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. **J Mol Biol.** 1989a;208:327-339.

Sacchettini JC, Banaszak LJ, Gordon JI: Expression of rat intestinal fatty acid binding protein in E. coli and its subsequent structural analysis: a model system for studying the molecular details of fatty acid-protein interaction. **Mol and Cell Biochem.** 1990;98:18-93.

- Neutra MR and Forstner JF. *In* Physiology of the Gastrointestinal Tract. Second edition. Edited by Leonard R. Johnson. Raven Press, NewYork. 1987. 975-1010.
- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen R , Ho W: A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. **Science**. 1972a: 52-64.
- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WKL. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. **Nature**. 1972b;177:56-58.
- Orsenigo MN, Tosco M, Zoppi S , Faelli A. Characterization of basolateral Na/H antiporter in rat jejunum. **BBA**. 1990;1026:64-68.
- Parker JC. Volume-responsive sodium movement in dog red blood cells. **Am J Physiol**. 1983; 244:c324-c330.
- Patton JS. Is the intestinal membrane bilayer freely permeable to lipophilic molecules? **INSERM Symp**. 1986; 2633-36.
- Perkins WR , Cafiso DS. Characterization of H⁺/OH⁻ currents in phospholipids vesicles. **J Bioenrg Biomem**. 1987a; 19:443-455.
- Perkins WR , Cafiso DS. Procedure using voltage-sensitive spin-labels to monitor dipole potential changes in phospholipid vesicles: the estimation of phloretin-

- Said HM, Tipton W, Nylander VV , Urban E: Effect of small bowel resection on the intestinal surface acid microclimate in the rat. **Digestion**. 1987a;38: 221-225.
- Said HM, Snith R, Redha R. Studies on the intestinal surface acidic microclimate: developmental aspects. **Pediatr Res**. 1987b;5:497-499.
- Sallee VL, Wilson FA, Dietschy JM. Determination of unidirectional uptake rates for lipid uptake across the intestinal brush border. **J Lip Res**. 1972;13:184-192.
- Sarosiek J, Slomiany A, Takagi A, Slomiany BL. Hydrogen ion diffusion in dog gastric mucus glycoprotein: effect of associated lipids and covalently bound fatty acids. **Biochem Biophys Res Comm**. 1984;118:523-531.
- Schacter D. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. **Hepatology**. 1984;4:140-151.
- Schoeller C, Keelan M , Thomson ABR: Oleic acid uptake into rabbit BBMV is partially protein-mediated by double exchange of Na⁺ and H⁺. **Z Gastroenterol- EITG abstracts**. 1992;3: 233.
- Sellers LA, Allen A. Gastrointestinal mucus cell rheology. **Soc Exp Biol**. 1989;65-71.
- Shepard K: The effect of mucus, mucilaginous materials on ion-distribution at epithelial surfaces. **Soc Exp Biol**. 1989: 123-130.
- Shiau Y-F, Levine GM. pH dependence of micellar diffusion and dissociation. **Am J Physiol**. 1980;239:G177-G182.

Shiau Y-F, Fernandez P, Jackson MJ, McMonagle S. Mechanisms maintaining a low pH microclimate in the intestine. **Am J Physiol.** 1985;248:G608-G619.

Shiau Y, Kelemen RJ, Reed MA: Acidic mucin layer facilitates micelle dissociation and fatty acid diffusion. **Am J Physiol.** 1990;259: G671-G675.

Shiau Y. *In* Physiology of the Gastrointestinal Tract. Second edition. Edited by Leonard R. Johnson. Raven Press, New York. 1987; 1527-1556.

Shiau B: Mechanism of intestinal fatty acid uptake in the rat: the role on an acidic microclimate. **J Physiol.** 1990;421: 463-474.

Shimada T, Oishi T. Role of the Na⁺/H⁺ antiport in intracellular pH regulation by rabbit enterocytes. **BBA.** 1987;901:265-272.

Shimada T, Hoshi T. Na⁺ dependent elevation of the acidic cell surface pH (microclimate pH) of rat jejunal villus cells induced by cyclic nucleotides and phorbol ester: possible mediators of the regulation of the Na⁺/H⁺ antiporter. **BBA.** 1988;937:328-334.

Silberberg A, Meyer FA. *In* Advances in Experimental Medicine. Vol 144, Edited by Eric N. Chantler, James B. Elder and Max Elstein. Plenum Press, New York. 1982. PP 53-74.

Singer SJ. On the fluidity and asymmetry of biological membranes. In: Perspectives in Membrane Biology (Estrada-O S, Gitler C, eds.) Academic Press: New York, 1974 131-147.

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science*. 1972;175:720-731.

Small D. Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. **Federation Proc.** 1970;29:1320-1326.

Small DM, Cabral DJ, Cistola DP, Parks JS, Hamilton JA. The ionization behavior of fatty acids and bile acids in micelles and membranes. *Hepatology*. 1984;4:77s-79s.

Stremmel W, Strohmeyer G, Borchard F, Kochwa S, Berk P. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1985a;82:4-8.

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization

Stremmel W. Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. **J Clin Invest**. 1988;82:2001-2010.

Stremmel W, Diede HE, Schrader M, Zimmerbeutel B, Hoppeler H, Passarella S, Doonan S. Further characterization of the membrane fatty acid binding protein (MFABP) by a monoclonal antibody to this protein. **Hepatology**. 1989;10:591 (abstract).

- Sundaram U, Knickelbein RG, Dobbins JW. pH regulation in ileum:Na⁺-H⁺ and Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in isolated crypt and villus cells. **Am J Physiol.** 1991;260:G440-G449.
- Sweetser DA, Birkenmeier EH, Hoppe PC, McKeel DW, Gordon JI: Mechanisms underlying generation of gradients in gene expression within the intestine: an analyses using transgenic mice containing fatty acid binding protein-human growth hormone fusion. **Genes Dev.** 1988;2:1318-1332.
- Thomson ABR and Dietschy J.M. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract. Ed by LR Johnson. Raven Press, New York. Chapter 46:1147-1220, 1981.
- Thomson ABR, Keelan M, Garg ML, Clandinin MT. Intestinal aspects of lipid absorption: in review. **Can J Physiol Pharmacol.** 1989a;67:179-191.
- Thomson ABR, Keelan M, Sigalet D, Fedorak R, Garg M, Clandinin MT. Patterns, mechanisms and signals for intestinal adaptation. **Dig Dis.** 1990;8:99-111.
- Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Fatty acid-induced alterations in transport systems of the small intestinal brush-border membrane. **Biochem Pharmacol.** 1988;37:1399-1405.
- Tse CM, Brant SR, Walker MS, Poysssegur J, Donowitz M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). **J Biol Chem.** 1992;267:9340-9346.

Tso P, Fujimoto K. The absorption and transport of lipids by the small intestine.

Brain Res Bull. 1991;27:477-482.

Veerkamp JH, Peeters RA , Maatman RGJ: Structural and functional features of different types of cytoplasmatic fatty acid-binding proteins. **BBA.** 1991; 1081:1-24.

Westergaard H. The passive permeability properties of in vivo perfused rat jejunum.

BBA. 1987;900:129-138.

Westergaard H, Dietschy JM. Delineation of the dimensions and permeability characteristics of the two major diffusion barriers to passive mucosal uptake in the rabbit intestine. **J Clin Invest.** 1974;174:718-732.

White DA. *In Form and Function of Phospholipids*, (Ansell GB, Dawson RMC, Hawthorne JN, eds.), Elsevier: Amsterdam. 1973:441-482.

Wien EM, van Campen DR . Mucus and iron absorption regulation in rats fed various levels of dietary iron. **J Nutr.** 1991;121:92-100.

TCC
UFSC
CM
0306

N.Cham. TCC UFSC CM 0306
Autor: Cabral Junior, Nel
Título: Absorção lipídica pela membrana



972801873

Ac. 253470

Ex.1

Ex.1 UFSC BSCCSM