

C

~~1978~~

t 3/59

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

CONTRIBUCION DEL CEREBRO Y DEL RIÑON AL METABOLISMO DEL ACIDO
MEVALONICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL POLLO

ANA LINARES GIL
Tesis doctoral

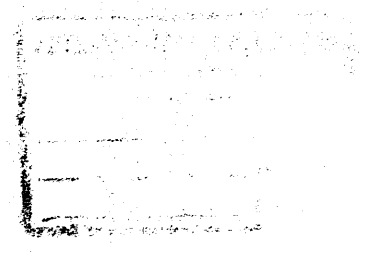
UNIVERSIDAD DE GRANADA
613451807
C15420477

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
- GRANADA -
C
109
31

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1978

CONTRIBUCIONES DEL CEMENTO Y DEL PÓVEDO AL REFRIGERANTE
MÉTODOS DURANTE EL DESARROLLO INDUSTRIAL EN

ANA URABE DE
1978



Tesis doctoral dirigida por D. Eduardo García Peregrín, profesor agregado de Bioquímica de la Facultad de Ciencias. Fue leída el día 29 de Septiembre de 1978, ante el tribunal formado por los profesores: Guirao Pérez; Abadía Fenoll; Sánchez de Medina Contreras; García Peregrín; López Rodríguez. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

Mi agradecimiento a D. Fermín Sanchez de Medina, Director del Departamento de Bioquímica.

Al Prof. Dr. D. Eduardo García Peregrín Director de esta tesis, mi gratitud por haberme iniciado en la investigación bioquímica, y por la ilusión y constante orientación con que ha seguido la realización de este trabajo.

A Juan Antonio Aguilera Mochón, Lola Gonzalez Pacanoska , Carmen Marco de la Calle y Matilde Barón Ayala por la gran ayuda que de ellos he recibido.

A Juan García Martínez, M^a Dolores Suárez, Hilario Ramirez, Josefa L. Segovia, M^a Dolores Franco, María Romero , Alberto Vargas y demás compañeros del laboratorio por su amistad y colaboración

A Pepe, a Eva

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
c. p. m.	Cuentas por minuto
D. O.	Densidad óptica
D. p. m.	Desintegración por minuto
DTNB	Acido 5-5'ditiobis (2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
F-PP	Farnesil pirofosfato
G-PP	Geranil pirofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
HMG	Acido 3-hidroxi-3-metil-glutárico
Ip-P	Isopentenil fosfato
Ip-PP	Isopentenil pirofosfato
ITP	Inosín trifosfato
JH	Hormona juvenil
ME	Mercapto etanol
MVA	Acido mevalónico
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
P-MVA	Acido fosfomevalónico
PP-MVA	Acido pirofosfomevalónico
p-HMB	Para hidroximercuribenzoato
UTP	Uridín trifosfato

INDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCION</u>	19
<u>I. - PARTE TEORICA</u>	25
1. 1. - <u>Biosíntesis del colesterol</u>	27
1. 1. 1. - Ruta metabólica	27
1. 1. 2. - Algunos aspectos de la regulación de la biosíntesis del colesterol a partir del MVA.	32
1. 1. 3. - Aspectos fisiológicos	38
1. 2. - <u>Biosíntesis del colesterol en pollo</u>	41
1. 3. - <u>Importancia del riñón en el metabolismo del MVA</u> ...	49
1. 4. - <u>Importancia del cerebro en el metabolismo del MVA.</u>	54
1. 5. - <u>Enzimas que catalizan la fosforilización del MVA</u> ..	56
1. 5. 1. - Mevalonato cinasa	56
1. 5. 2. - Fosfomevalonato cinasa	85
<u>II. - PLAN DE TRABAJO.</u>	91
<u>III. - PARTE EXPERIMENTAL.</u>	95
3. 1. - <u>Material y métodos.</u>	97
3. 1. 1. - Material biológico	97
3. 1. 2. - Preparaciones enzimáticas.	97
3. 1. 3. - Preparación de tampones	98
3. 1. 4. - Determinación del contenido protéico.	98
3. 1. 4. 1 - Curva patrón de la albúmina.	98
3. 1. 4. 2. - Metódica	99
3. 1. 4. 3. - Cálculos.	100
3. 1. 4. 4. - Reactivos.	100
3. 1. 5. - Determinación de la actividad enzimática.	102

	<u>Página</u>
3. 1. 5. 1. - Reacciones enzimáticas.....	102
3. 1. 5. 2. - Reactivos utilizados.....	102
3. 1. 6. -Determinación y medida de los productos de la reacción.....	103
3. 1. 6. 1. - Radiocromatografía en papel.....	103
3. 1. 6. 2. - Detección y medida de radiactividad.	105
3. 1. 6. 3. - Expresión de la actividad específica.	105
3. 2. - <u>Resultados</u>	108
3. 2. 1. - Fosforilación del ácido mevalónico en cerebro de pollo recién nacido	108
3. 2. 1. 1. - Influencia de la concentración de pro- teínas de los extractos enzimáticos..	108
3. 2. 1. 2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones	108
3. 2. 1. 3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA	110
3. 2. 1. 4. - Distribución intracelular de los enzi- mas fosforilantes del MVA	110
3. 2. 1. 5. - Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA	113
3. 2. 1. 6. - Efecto de los nucleótidos	113
3. 2. 1. 7. - Efecto de los cationes divalentes	116
3. 2. 1. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos - SH	122
3. 2. 1. 9. - Efecto de algunos inhibidores de gru- pos -SH	122
3. 2. 1. 10. -Influencia de la edad del pollo	126
3. 2. 1. 11. -Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta	129
3. 2. 1. 12. -Influencia del ayuno	132
3. 2. 1. 13. -Influencia del ritmo luz-oscuridad...	132

3. 2. 2. -Fosforilación del ácido mevalónico en riñón de pollo recién nacido	135
3. 2. 2. 1. - Influencia de la concentra- ción de proteínas de los ex- tros enzimáticos.....	135
3. 2. 2. 2. - Influencia del tiempo de in- cubación de las reacciones.....	135
3. 2. 2. 3. - Efecto del pH sobre la for- mación de derivados fosfo- nilados del MVA	137
3. 2. 2. 4. - Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico.....	140
3. 2. 2. 5. -Estabilidad térmica de la me- valonato cinasa y fosfomevalo- nato cinasa.....	140
3. 2. 2. 6. - Efecto de los nucleótidos	143
3. 2. 2. 7. - Efecto de los cationes divalentes..	145
3. 2. 2. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos - SH	148
3. 2. 2. 9. - Efecto de algunos inhibidores de grupos - SH	152
3. 2. 2. 10. -Influencia de la edad del pollo ...	155
3. 2. 2. 11. -Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta	155
3. 2. 2. 12. -Influencia del ayuno	159

3. 2. 2. 13. - Influencia del ritmo luz-oscu-
ridad 159

IV. - DISCUSION 162

V. - CONCLUSIONES 181

VI. - BIBLIOGRAFIA 187

INTRODUCCION

INTRODUCCION

En términos generales, se han observado características comunes y diferenciales en el metabolismo en mamíferos y aves. Concretamente en el metabolismo lipídico, el pollo difiere en varios aspectos de los mamíferos. Así, mientras en la rata el tejido adiposo es el principal responsable de la síntesis de ácidos grasos, en el pollo esta síntesis se localiza fundamentalmente en el hígado, lo que sugiere que la función del tejido adiposo es principalmente de almacenamiento y eliminación de lípidos más que una función de síntesis como es el caso de la rata.

Por otra parte, aunque la mayoría de los animales y el propio hombre son capaces de sintetizar gran parte del colesterol que requieren, los datos en el pollo son contradictorios, desconociéndose con seguridad si el colesterol de los tejidos de pollo recién nacido ha sido transferido desde la yema del huevo ó ha sido sintetizado en tejidos propios del polluelo ó en las membranas embrionarias. Diversos investigadores sostienen que en el embrión debe ocurrir, al menos en parte, la biosíntesis del colesterol, biosíntesis que debe ser especialmente activa en el cerebro, si bien la mayor parte del colesterol del polluelo procede del saco vitelino.

En efecto, a lo largo del desarrollo y del crecimiento ocurren profundos cambios en la estructura y función del sistema nervioso que concierne específicamente a las alteraciones en la concentración y composición de los lípidos y a los cambios en su metabolismo. Desde que los

primeros estudios de Schmidt y de Fernandez-Morán demostraron que la mielina está constituida por capas alternas de lípidos y proteínas, son muchos los trabajos llevados a cabo con objeto de conocer sus caracteres histoquímicos y bioquímicos. Todos ellos coinciden en demostrar que el colesterol es el componente mayoritario de la mielina, habiéndose considerado que, en conjunto, constituyen alrededor del 20% de todos los lípidos del cerebro. Las especies animales que han sido estudiadas más intensamente en este aspecto son los mamíferos y entre ellos, concretamente, la rata y el ratón. Los datos en el hombre, que lógicamente son de la mayor importancia, son muy escasos.

El desarrollo de la mielina en el hombre ocurre antes del nacimiento y continúa durante varios años después. Durante este periodo, la proliferación glial y el depósito de mielina coinciden con un incremento en la coordinación de movimientos. La mielinización óptima depende de la presencia de varias hormonas y de un adecuado estado nutricional durante el desarrollo. Una mielinización precoz puede afectar a la maduración cerebral, implicando una proliferación glial y otros efectos que originan un cerebro anormalmente pequeño.

En el pollo, el proceso de mielinización ocurre durante la fase embrionaria, por lo que este animal, al igual que el cobjaya, nace virtualmente mielinizado. Así pues, la química del pollo en su estado embrionario y postnatal puede aportar luz a los problemas presentados en otros animales en su periodo perinatal.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia del colesterol en el sistema nervioso, los pasos individuales de su biosíntesis no han sido estudiados con detalle en el cerebro. La secuencia de reacciones por las que se biosintetiza el colesterol a partir de acetil-CoA constituye uno de los pasos metabólicos más complejos en las células eucarióticas. En la biosíntesis del colesterol suelen distinguirse dos grandes etapas claramente diferenciadas. La primera comprende la transformación del acetato en mevalonato, mientras que la segunda consiste en la transformación de mevalonato en colesterol, vía isopentenil pirofosfato y escualeno. Aunque esta segunda etapa no parece estar tan bien controlada como la primera, en mamíferos se ha demostrado su regulación a nivel de la mevalonato cinasa por diversos intermediarios del proceso, como son el geranyl-pirofosfato y el farnesil-pirofosfato. Asimismo, en ratas se ha demostrado un cierto efecto inhibitor del propio colesterol sobre la fosforilación del ácido mevalónico.

En los últimos años se ha demostrado que el colesterol y otros derivados isoprenoides no son los únicos productos resultantes del metabolismo del ácido mevalónico. Algunos tejidos, como el cerebro de la rata recién nacida, incorporan cantidades significativas de ácido mevalónico a ácidos grasos mediante un proceso conocido con el nombre de "shunt" del mevalonato, en el cual el dimetilalilpirofosfato es transformado en β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA vía dimetilacrilil-CoA y metilglutaril-CoA. El HMG-CoA es entonces transformado en acetoacetato y éste en acetil-CoA, sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos.

El descubrimiento de esta vía metabólica ha abierto nuevas líneas de investigación en este campo. Concretamente en rata, más de la mitad de la cantidad total de mevalónico que es incorporado via "shunt" para formar compuestos no esteroídicos parece ser metabolizado por los riñones. Esta consistente localización renal del "shunt" contrasta con la distribución tisular de la vía que conduce a los esteroides, en la que el hígado manifiesta aproximadamente la misma actividad que el riñón, siguiéndole en importancia la contribución del cerebro.

Recientemente parece haberse demostrado que los cuerpos cetónicos juegan un papel fundamental en el sistema nervioso central durante el proceso de mielinización, no solo como fuentes de energía sino también como suministradores de esqueletos carbonados para la biosíntesis lipídica.

Resulta de todo ello que existe una clara interdependencia entre hígado, riñón y cerebro durante la mielinización, no solo en lo que respecta al aprovechamiento del colesterol y ácidos grasos por el cerebro sino también por cuanto el hígado es el órgano productor de los compuestos cetónicos. Es posible que la intervención del tejido renal en el metabolismo de los cuerpos cetónicos durante la mielinización en el pollo sea semejante a lo que ocurre en ratas lactantes. Sin embargo es muy poco lo que se sabe del metabolismo en el pollo durante su desarrollo embrionario y postnatal, por lo que la participación del cerebro, riñón e hígado deberá ser confirmada experimentalmente.

En este sentido, en la presente Memoria Doctoral hemos comenzado el estudio de las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico, como primeras etapas de su incorporación a esteroides y compuestos no isoprenoídeos, por preparaciones enzimáticas de cerebro y de riñón de pollo recién nacido. Se han escogido pollos desde el momento de la eclosión hasta los diez días de vida, estudiando en ellos las variaciones exhibidas por las dos primeras actividades enzimáticas de la ruta biosintética mencionada. En otros trabajos actualmente en realización en nuestro Departamento, se está llevando a cabo el estudio del mismo proceso durante la fase embrionaria, completando con ello el conocimiento de la contribución que los tres órganos antes reseñados presentan en las primeras fases de la incorporación del ácido mevalónico a lo largo de la mielinización del pollo

Con este mismo objeto, se presentan en esta Memoria Doctoral los resultados obtenidos "in vitro" sobre las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico, que han permitido poner de manifiesto algunas de las propiedades de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo recién nacido.

Asimismo se ha estudiado la posible influencia que la alimentación puede tener sobre ambas actividades enzimáticas, bien directamente mediante la suplementación de colesterol a la dieta ó mediante el ayuno ó bien indirectamente sometiendo a los animales a un ritmo cíclico de luz-oscuridad. La corta edad de los animales utilizados en estas experiencias hace que los resultados obtenidos en este aspecto no

sean completamente definitivos, debiéndose completar posteriormente con pollos adultos que puedan ser sometidos a análogos tratamientos pero más prolongados.

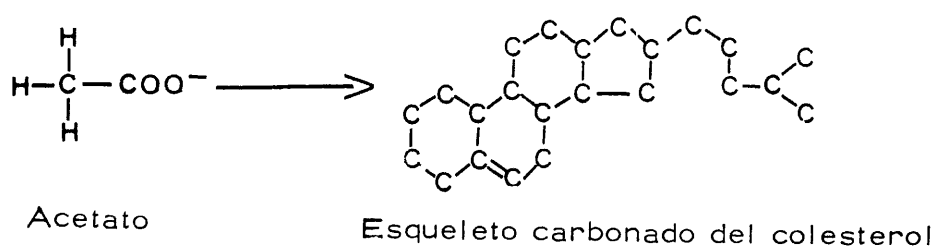
I. - PARTE TEORICA

1.1. - Biosíntesis del colesterol

1.1.1. - Ruta metabólica

Durante los últimos años se han publicado algunas revisiones que han tratado de aspectos de la biosíntesis de compuestos isoprenoides. E. D. Beytia y J. W. Porter (1) hicieron una evaluación crítica de las investigaciones más recientes sobre las reacciones que dan lugar a la formación de dichos compuestos.

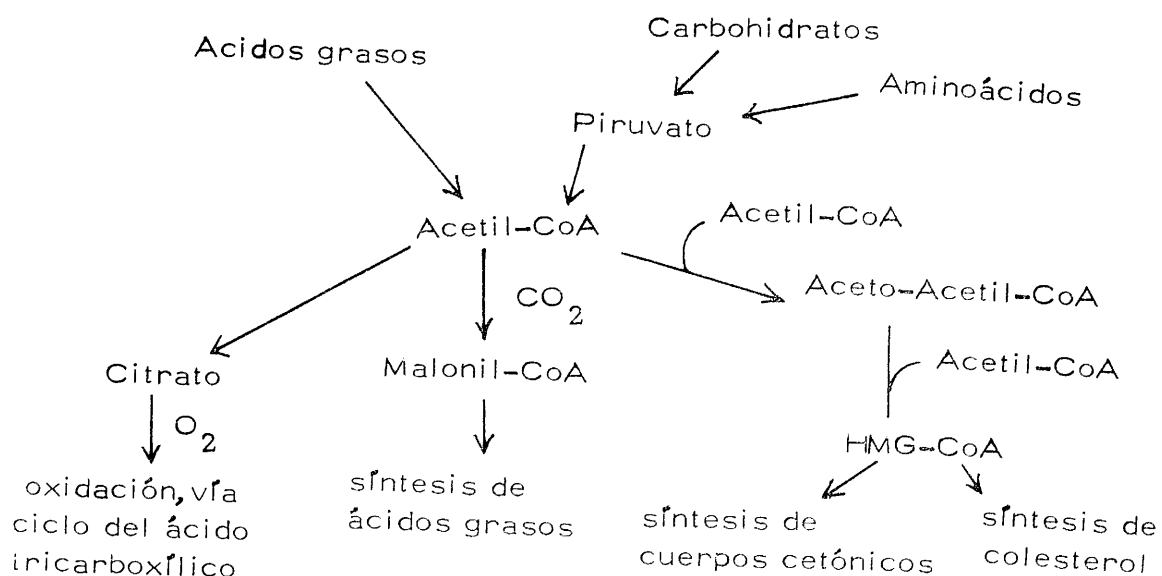
Con respecto a la biosíntesis del colesterol contemplaron las aportaciones de Bloch y de Caszforth y Popjak que han demostrado que el esqueleto carbonado del colesterol deriva completamente del acetato. A principios de los años 40. Bloch y col demostraron que los átomos de carbono de un acetato marcado isotópicamente en sus carbonos y administrado por vía oral a ratas se incorporaban al colesterol del hígado. Descubrieron que tanto el núcleo esteroide como la cadena lateral de ocho carbonos del colesterol aparecían marcados.



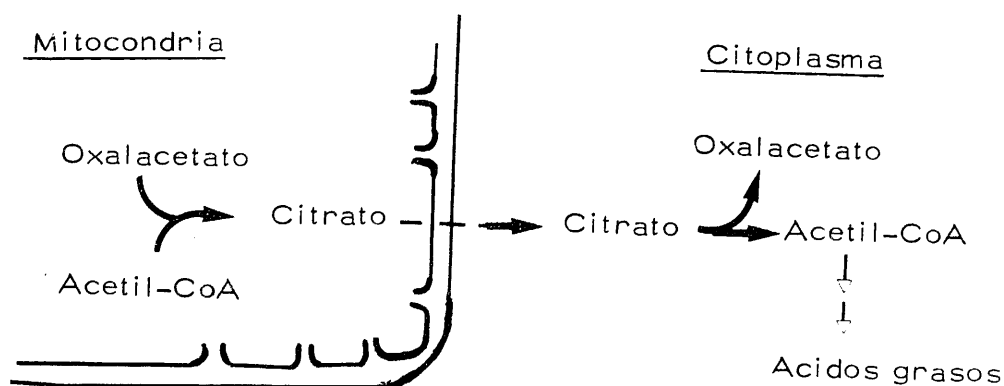
Tanto el carbono del grupo metilo como el del grupo carboxilo se incorporan al colesterol en cantidades aproximadamente iguales, de hecho todos los átomos de colesterol proceden del acetato.

El descubrimiento de la ruta que siguen los carbonos del acetato hasta la formación de isopreno activo ha permitido un examen exhaustivo de los compuestos C_5 y C_6 como posibles precursores de isoprenoides. El descubrimiento del ácido mevalónico, (revisado por Wagner y Folkers (2)) y el hallazgo por Tavormina y col (3) de que este compuesto es un buen precursor del colesterol abrió el estudio de las reacciones intermediarias de la biosíntesis de isoprenoides.

La biosíntesis del ácido mevalónico se ha estudiado por sistemas enzimáticos solubles y por sistemas enzimáticos microsomales y solubles. Actualmente la primera vía puede considerarse de menor importancia, ó incluso constituida artificialmente durante el proceso de homogeneización por desorganización de los compartimentos celulares. En la segunda vía, la más importante, todos los intermediarios estan unidos al CoA. La primera reacción es la activación del acetato a acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa en el citoplasma, aunque este compuesto puede formarse a través de una gran variedad de rutas metabólicas tales como la oxidación de ácidos grasos y la descarboxilación oxidativa del piruvato.

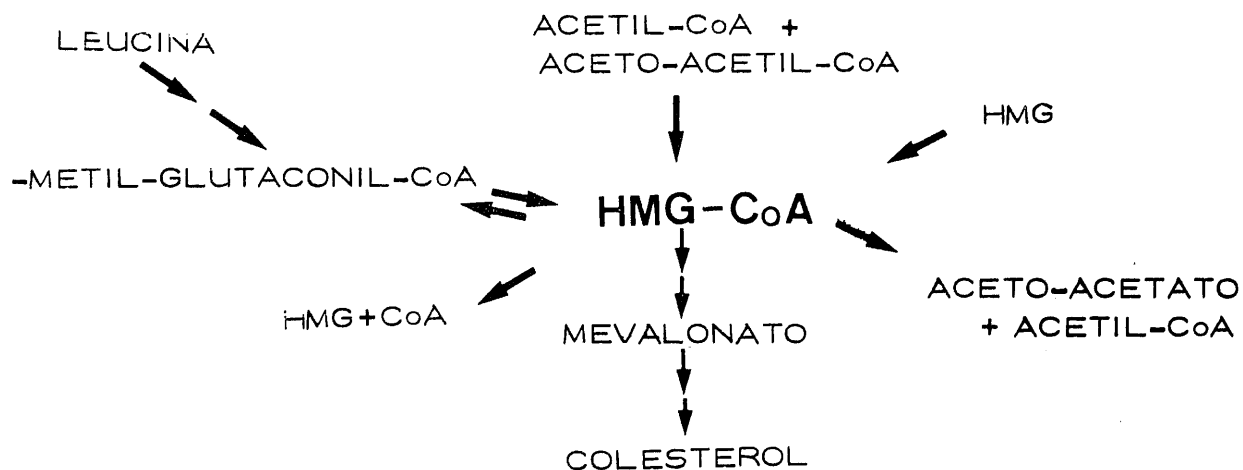


El acetil-CoA es un sustrato común a la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos. Para el control de la biosíntesis del colesterol son importantes los mecanismos de regeneración de acetil-CoA extramitocondrial, por lo que un punto de control es el paso del acetil-CoA procedente de la oxidación de ácidos grasos y descarboxilación oxidativa del piruvato, procesos que tienen lugar dentro de la mitocondria, a través de la membrana mitocondrial por la lanzadera de citrato principalmente(4).

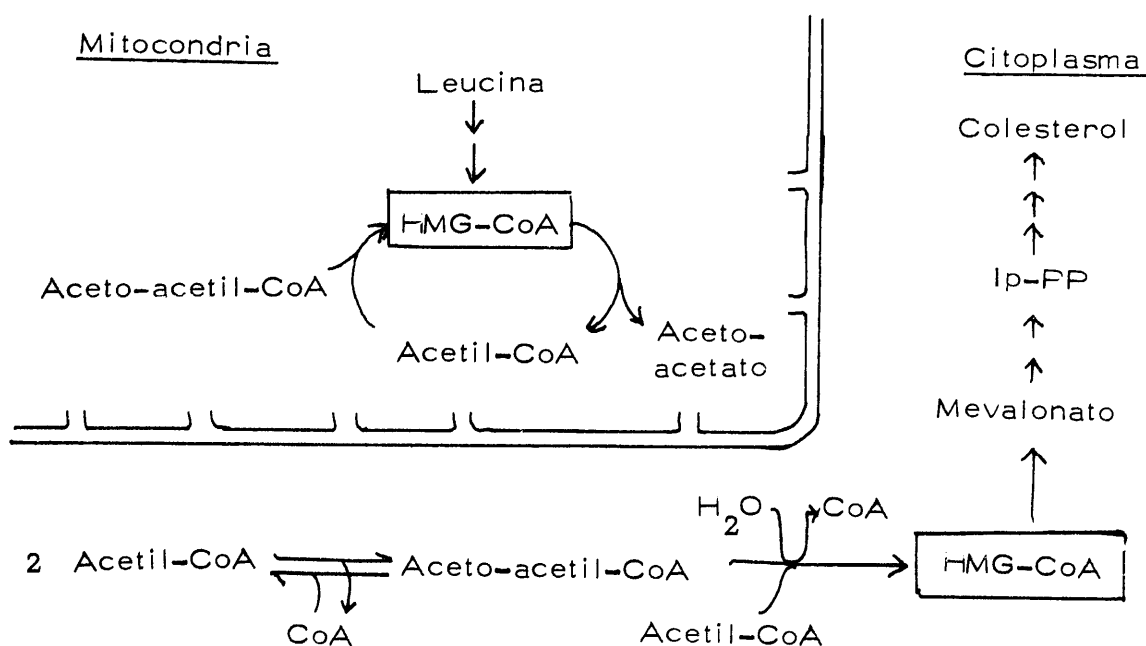


Dos moléculas de acetil-CoA se unen para formar aceto-acetil-CoA; esta reacción es catalizada por una tiolasa en la fracción microsomal. Bajo condiciones fisiológicas la reacción catalizada por la tiolasa favorece la formación de Aceto-acetil-CoA ya que este producto es movilizado por la reacción siguiente que sintetiza el β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA. La síntesis del HMG-CoA a partir de aceto-acetil-CoA y acetil-CoA es catalizada por la HMG-CoA sintetasa en la fracción soluble.

El HMG-CoA participa en varias vías metabólicas:



La formación de ácido mevalónico requiere la reducción del HMG-CoA por la HMG-CoA reductasa. Este sistema enzimático está siendo intensamente estudiado ya que la reacción que cataliza es el paso limitante de la biosíntesis del colesterol en hígado bajo la mayor parte de las condiciones. La regulación de la HMG-CoA reductasa ha sido revisada recientemente (5). Sin embargo es necesario considerar la compartimentación de la síntesis de colesterol y la formación de cuerpos cetónicos para poder explicar la regulación de ambas vías metabólicas (4) y reafirmar así el papel regulador de la HMG-CoA reductasa.



El paso de ácido mevalónico a isopentenil pirofosfato es catalizado por tres enzimas: mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa, de cuyas características se hace una amplia revisión en el apartado 1.5 y la fosfomevalonato descarboxilasa que ultimamente también se está estudiando como enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol (6).

La biosíntesis de pirofosfatos alílicos implica la isomerización del isopentenil-PP (Ip-PP) a un compuesto alílico, dimetil-alil-PP y la condensación cabeza cola de Ip-PP y dimetil-alil-PP para dar sucesivamente geranil ó meryl-PP (trans ó cis, C₁₀) y farnesil-PP (C₁₅). La condensación de dos moléculas de farnesil-PP

da un intermediario C₃₀, preescualeno pirofosfato, el cual es convertido en escualeno en presencia de NADPH; ambas reacciones, condensación y reducción, son llevadas a cabo por el mismo sistema enzimático (1). La reacción de formación del lanosterol tiene lugar en los microsomas pero con la participación de dos proteínas citoplasmáticas portadoras de esteroides. Desde el lanosterol se puede formar colesterol ya sea pasando por el desmosterol ó por el 7-dehidroxilesterol. R.C. Johnson y col (7) han hecho un estudio comparativo de la biosíntesis de colesterol a partir de escualeno, lanosterol y desmosterol en la fracción microsomal de cerebro, hígado corazón y riñón.

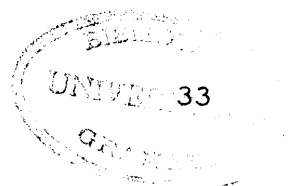
1.1.2. - Algunos aspectos de la regulación de la biosíntesis de colesterol a partir del MVA

La incorporación de MVA a colesterol y compuestos relacionados, ha sido estudiada en diversos orígenes y condiciones experimentales. Así, se ha puesto de manifiesto en hígado de diversas razas de ratones (8, 9) en riñón e hígado de hamsters, perro y oveja (10) y en homogenados de aorta de cerdo (11, 12) Edgren y Helltrön (13), después de la inyección parenteral de MVA-2-¹⁴C observaron que aparecen más productos marcados en el riñón que en el hígado. Mientras que en el hígado la mayor parte de la radiactividad aparece como colesterol, en el riñón se encuentra repartida entre escualeno y lanosterol.

Entre todos los factores que intervienen en la regulación de la biosíntesis del colesterol, los más estudiados son el ritmo luz-oscuridad, el desarrollo y la alimentación.

Back y col (14) encontraron que la incorporación de MVA a esteroides no varia significativamente entre el medio-día y la media-noche . Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hickman y col (15). Sin embargo recientemente los trabajos de Bhat y Ramasarma (16) han demostrado la existencia de ritmo diurno en la conversión de MVA a esteroides; ritmo que sería debido a la conversión de MVA a isopentenil-PP ya que experiencias paralelas de medida de $^{14}\text{C O}_2$ procedente de descarboxilación de MVA-1- ^{14}C muestran las mismas variaciones a lo largo del día. Estas discrepancias pueden deberse a que Baht y Ramarma trabajaron con una concentración de MVA 50 veces superior a la requerida para la saturación de sustrato.

i En las primeras etapas del desarrollo animal, cuando todavía es lactante, la incorporación del MVA a esteroides es baja mientras que en animales destetados esta incorporación es considerablemente mas alta. Según esto, Shah (17) indica que la actividad de una ó más enzimas de esta vía metabólica cambia a partir del destete del animal y pueden actuar como enzimas reguladoras en la síntesis del colesterol en ratas lactantes, en las que esta reducción en la síntesis del colesterol puede estar causada por el colesterol de la leche materna.



Jhonson y Shah (18) estudian la formación de colesterol a partir del MVA en ratas lactantes así como en ratas destetadas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol. En las ratas alimentadas así, disminuye la formación de colesterol con respecto a animales alimentados con dieta estandar. En experiencias con ratas sometidas a ayuno, realimentando después con dieta normal, se observa que aumenta la formación de esteroides después de la alimentación, aumento que es suprimido si la alimentación se hace con una dieta suplementada con colesterol.

Estudios más recientes de Ramachandran y Shah (6) demuestran que la descarboxilación del PP-MVA es más alta en ratas destetadas que en ratas lactantes. Esta descarboxilación disminuye un 50 - 80 % en ratas destetadas y alimentadas con una dieta suplementada con colesterol. Esto parece demostrar que la etapa de formación del isopentenil-PP es limitante en la conversión del MVA a esteroides.

Gould y Swyoyd (19) han observado una inhibición de la conversión del MVA en colesterol en hígado de ratas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol, inhibición que es total al año de someter al animal a esta alimentación. Con objeto de establecer el punto en el que se dá la inhibición, los autores han hecho experiencias en distintas etapas de esta vía metabólica demostrando que la conversión de escualeno a colesterol no disminuye, aunque sí lo hacen las etapas de farnesil PP a colesterol y de MVA a farnesil-PP. De todas formas, la inhibición observada en la conversión de MVA a colesterol es menor que la observada a partir de acetato.

En ratas alimentadas con una dieta rica en ácido cólico, la síntesis de colesterol a partir de MVA se inhibe un 40% mientras que a partir de acetato se inhibe casi completamente.

Sin embargo, Shapiro y Rodwel (20) han encontrado que después de 10 h de alimentación con una dieta rica en colesterol no se afecta la conversión de MVA en colesterol.

El ayuno inhibe casi totalmente la formación de colesterol a partir de MVA. Pero según Slakey y col (21) la realimentación con una dieta libre de grasas aumenta esta biosíntesis hasta sus valores normales a las 72 horas.

La necesidad de una fuente calórica es indispensable para la biosíntesis de colesterol pues, según Subbarao y Ramansarma (22) la inyección de ATP a animales que tienen bajo nivel de síntesis de colesterol debido al ayuno, hace que aumente esta biosíntesis aunque el ATP tiene influencia en una etapa anterior al MVA pues la formación de esteroides a partir de MVA no se afecta con esta inyección de ATP.

En ratas inyectadas con MVA y alimentadas con colesterol en la dieta, Raicht y col (23) han observado que aumenta la absorción de colesterol y unido a ello se inhibe su biosíntesis. Sin embargo la adición de β -sitosterol a la dieta inhibe totalmente la absorción de colesterol y aumenta ligeramente su síntesis.

Cuando los animales ingieren una dieta normal suplementada con 5% de colesterol Wiss (24) ha encontrado una ligera inhibición en la formación de colesterol a partir de MVA, aumentando al mismo tiempo la formación de lanosterol y escualeno. El mismo autor (25) ha encontrado que la conversión de MVA a colesterol se inhibe alimentando al animal con una dieta lipogénica de alto contenido en glucosa (70%) localizándose esta inhibición entre lanosterol y colesterol.

En animales sometidos a una hepatectomía parcial, no aumenta la síntesis de colesterol a partir de MVA después de la operación. La posterior alimentación con una dieta rica en colesterol tampoco cambia esta incorporación con respecto a animales control.

La influencia de ciertos aniones minerales sobre la biosíntesis del colesterol a partir de MVA ha sido estudiado por Rodriguez y Leal (26). La radiactividad incorporada al colesterol, es menor en presencia de fluoruro que en presencia de cloruro, tanto más cuanto la concentración de los iones en el medio es mayor. Asimismo el ion fluoruro no parece ejercer un efecto inhibitor de este proceso ya que al aumentar la concentración de ión disminuye la conversión de MVA a colesterol.

Horuby y col (27) han estudiado el efecto de los grupos tiol sobre la síntesis del colesterol a partir de MVA. En presencia de β -mercaptoetanolamina, β -mercaptoetano y etanotiol se ha observado cierta inhibición de este proceso, acumulándose lanosterol y Δ^8 lanosterol. La cisteína y el glutatión también producen inhibición pero no acúmulo de los intermediarios citados.

Kuroda y Eudo (28) han estudiado "in vitro" la inhibición de la biosíntesis del colesterol por ácidos grasos. La incorporación del MVA es inhibida por ricinoleato (hidroxiácido) y fitanato (ramificado) en una etapa comprendida entre el escualeno y el lanosterol. En presencia de triarimol, que es un inhibidor de la eliminación del grupo 14-metil del lanosterol y sus metabolitos, se ha encontrado una fuerte inhibición de la incorporación de MVA a colesterol y precursores (29) observándose además acumulación de lanosterol y 24, 25-dihidrolanosterol.

En la grasa del epidídimo Durr (30) ha estudiado la incorporación de MVA a esteroides observando que 70 horas de ayuno reduce esta incorporación al 30% con respecto a ratas alimentadas. La adición de glucosa no estimula la incorporación de MVA y de hecho a altas concentraciones de glucosa inhibe el proceso tanto en animales alimentados como ayunados. Por otra parte el citrato es estimulante pero no restaura completamente la actividad. En presencia de inhibición del mecanismo de producción o utilización de energía se inhibe la utilización del MVA en la síntesis de esteroides. También inhiben este proceso los ácidos biliares taurocólico y glicocólico. Durr y Murad (31) han estudiado la incorporación de MVA por la mucosa intestinal de rata. El glutatión reducido y el ácido ascórbico inhiben un 50% este proceso mientras que el DTT y la cisteína no tienen ningún efecto. También inhiben la incorporación de MVA los ácidos biliares.

1. 1. 3. - Aspectos fisiológicos

En todo organismo en estado estable cada parte componente tiene un equilibrio dinámico; ésto implica que la suma de los productos de entrada es igual a la suma de los productos de salida. Hay dos procesos de entrada en el caso del colesterol: absorción intestinal del colesterol de la alimentación y biosíntesis (32), y dos principales procesos de salida: Transformación en ácidos biliares (33) y excreción (34).

Con métodos de trazas nucleares y técnicas "in vitro" se ha avanzado mucho en el estudio de la biosíntesis del colesterol, aunque las principales evidencias de biosíntesis fueron encontradas "in vivo" (32). Un experimento muy usado "in vitro" con el que se han obtenido muchas de las conclusiones citadas en apartados anteriores, es la incubación de cortes de un órgano en un medio nutritivo adecuado a 37°C con un precursor del colesterol marcado y después de una ó dos horas de incubación se aísla el colesterol. Entonces se determina el porcentaje de actividad ^{14}C de precursor encontrado en el colesterol.

Desde el punto de vista fisiológico las preguntas que han de ser contestadas son: ¿Se sintetiza el colesterol en todos los órganos del cuerpo? ¿Con qué velocidad ocurre esta síntesis? ¿La velocidad de síntesis está ajustada a la cantidad de colesterol ingerido?. La respuesta a la primera pregunta se encontró en 1946 (35, 36) usando técnicas "in vitro" y los resultados han sido repetidamente confirmados (37, 38). La respuesta a la segunda pregunta ocurrió en 1950

(39, 40). La conclusión propuesta es que el órgano más importante para la biosíntesis del colesterol es el hígado porque es en este órgano donde se observa el porcentaje de precursores a colesterol más alto (37, 38). Ahora este punto de vista es aceptado ampliamente y demostrado (41, 42). Además cuando el colesterol es añadido a la comida de animales la incorporación de los precursores en hígado está considerablemente reducida como resultado de la inhibición de la β -hidroxi β -metil-glutaril-CoA-reductasa.

En el estudio de la biosíntesis del colesterol surge otra dificultad que es la movilidad de las moléculas de colesterol (43, 44, 45). En efecto, hay cambios por momentos entre el colesterol del plasma el cual constituye un "compartimento central" y el colesterol de los órganos el cual presenta un "comportamiento periférico".

Sobre la velocidad a la que estos cambios tienen lugar se sabe muy poco aunque puede ser muy rápida como en el caso de los eritrocitos (46, 47). Experimentos "in vivo" después de la administración de colesterol marcado demuestran que los cambios en la actividad de un órgano tienen lugar siguiendo un patrón cinético, que depende en parte de la síntesis ocurrida "in situ" y en parte de los cambios entre el órgano y el plasma. Así, estos estudios han permitido definir de forma precisa las características funcionales de la síntesis en órganos mediante técnicas cinéticas. Sin embargo, no se sabe realmente qué papel juegan los órganos, independientemente unos de otros y todos como un sistema en armonía, especialmente el hígado, en la secreción interna del colesterol.

En experimentos en los que se utiliza en la dieta colesterol radiactivo, que hacen posible ver la secreción interna de colesterol, se demuestra que hay grandes diferencias del comportamiento "in vivo" e "in vitro". El método del equilibrio isotópico descrito primero en 1956 (43), estandarizado en 1966 (48) y revisado en 1972 (49) hace posible que F. Chevallier y col (50) aborden los problemas de la biosíntesis del colesterol, encontrándose con la sorpresa de que alimentando con colesterol en una serie de proporciones 1:7, 1:40 y 1:130 no se altera la secreción interna, además la biosíntesis era significativamente más alta, bajo un régimen de concentración más rica. Estos resultados no son como los obtenidos "in vitro" y además sugieren que al no corresponder la regulación inhibitoria descrita "in vitro" en hígado con los hechos observados "in vivo", ó que el hígado no es el mejor responsable de la biosíntesis del colesterol en el cuerpo ó que el mecanismo regulatorio opera en el hígado pero no gobierna el balance en el cuerpo totalmente.

Más recientemente se ha demostrado indirectamente (51, 52) y directamente (53) que el tracto digestivo (especialmente del intestino) es reponsable por lo menos del 56% de la biosíntesis del colesterol de ratas adultas machos.

1. 2. - Biosíntesis del colesterol en pollo

La mayoría de los estudios bioquímicos en las aves han sido llevados a cabo durante los últimos 15 años y se han centrado principalmente en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. La mayoría de los trabajos han sido hechos usando aves domésticas. Estas investigaciones han demostrado que cualitativamente la mayoría de las vías metabólicas son similares en aves y mamíferos pero hay importantes diferencias cuantitativas en las actividades relativas de alguna de esas vías y de enzimas individualmente consideradas.

Con respecto a la lipogénesis se ha comprobado en pollo (54, 55) que el tejido adiposo puede incorporar glucosa y acetato a ácidos grasos pero en comparación con la rata estos sustratos son utilizados más rápidamente por el tejido de la rata (56, 55). La velocidad de incorporación de glucosa a ácidos grasos en el pollo es mucho mayor en el hígado que en el tejido adiposo (57, 55). Incluso se ha calculado (58) que el hígado es el responsable del 90 al 95% de la síntesis de ácidos grasos en el pollo. También se ha demostrado ser el hígado el mejor sitio para la lipogénesis en paloma (59, 60) y en pato (61)

Durante el desarrollo embrionario la lipogénesis es muy baja (62, 63) seguramente por el alto contenido en grasas de la yema del huevo en la que se desarrolla el embrión. Después de la eclosión, la alimentación cambia de un alto contenido en grasas del embrión a un alto contenido en hidratos de carbono de los cereales y la cantidad de lipogénesis del hígado aumenta rápidamente (57). En este sentido se

ha demostrado que las actividades de varias enzimas hepáticas implicadas en la conversión de glucosa a lípidos también se incrementan fuertemente durante el periodo postnatal. Sin embargo las actividades de las mismas enzimas en tejido adiposo de varias especies de aves permanecen bajas después del nacimiento hasta unas 4 semanas después de la eclosión.

Estudios "in vitro" y en pollos intactos demuestran pues, que el hígado es el mejor sitio para la biosíntesis de lípidos. Además, en pollo y seguramente en otras especies de aves, los ácidos grasos son sintetizados en el hígado y transportados como triglicéridos en el plasma, pasan a lipoproteínas de baja densidad y van al tejido adiposo para su almacenamiento. El pollo es por tanto, un animal modelo de un sistema bastante distinto de los animales normalmente empleados en el laboratorio, los roedores (64, 65) en los que los ácidos grasos son sintetizados principalmente en el mismo sitio donde se almacenan. Esto hace que se pueda usar un modelo no corriente para estudiar la regulación de síntesis de lípidos en un órgano, así como la regulación del transporte de lípidos. Además investigaciones de la lipogénesis hepática y su regulación en el pollo serían de considerable interés y pueden contribuir significativamente a nuestro entendimiento sobre la regulación del metabolismo de lípidos en el hombre ya que recientes estudios (66, 67, 68) indican que en el hombre, el hígado es también el mejor lugar de biosíntesis de ácidos grasos.

La dieta de grasas y proteínas, por diferentes mecanismos, ejerce un efecto sobre la síntesis hepática de lípidos. La capacidad

lipogénica en el pollo decrece marcadamente cuando se mantienen en ayunas durante cortos periodos de tiempo. Restringiendo la comida durante 2 h. decrece la lipogénesis hepática alrededor del 90% y realimentando durante 1 h ó con la administración intravenosa de glucosa ó fructosa se restaura la capacidad lipogénica. El mecanismo que se propone para esta regulación (70) implica que la depresión de la síntesis de ácidos grasos por ayuno ó alimentación grasa es acompañada y probablemente precedida de un incremento del nivel de ácidos grasos libres en el plasma. Bajo éstas condiciones aumenta el nivel de la cadena grasa de acil-CoA que inhibe el transporte de citrato a través de la membrana y la acetil-CoA carboxilasa, inhibiendo por tanto la síntesis de ácidos grasos. Así, medidas paralelas de síntesis de colesterol y ácidos grasos muestran la bajada total a los tres días de ayuno y una subida rápida con la realimentación.

Los pollos alimentados con una dieta de alto contenido de proteínas tienen una razón lactato / piruvato menor, esto indica una mayor oxidación citoplasmática. Este cambio del estado redox puede ser asociado con el control de la síntesis de lípidos. La tiroxina y el glucagón tienen efecto, la primera como activadora y el glucagón, como inhibidor; en la síntesis hepática de ácidos grasos, sin embargo la insulina parece tener un bajo papel.

R. A. Teekell y col (71) estudian el efecto del sexo y dieta de colesterol, esteárico, oléico y / ó linoléico en la deposición de colesterol en la sangre, hígado y aorta. Después de 5 meses de dieta de régimen a algunos de ellos se les administra oralmente $1-^{14}\text{C}$ acetato sódico y colesterol $1, 2, \text{H}^3$ para determinar si el colesterol que contienen los tejidos es de origen endógeno ó exogeno. Se observó que los machos tienen unos niveles de colesterol libre más altos que las hembras. La adición de colesterol (2%) y ácidos grasos (6%) incrementa los niveles de colesterol libre en el hígado y aorta. El colesterol almacenado en hígado y aorta se encuentra principalmente como colesterol libre mientras que en la sangre el colesterol está en forma esterificada. El colesterol en hígado y aorta es principalmente de origen endógeno.

En vista de que el sistema linfático del pollo es muy rudimentario, la gran cantidad de colesterol de la dieta es transportado en las dos formas libres y esterificado. Sin embargo las tres-cuartas partes del colesterol encontrado en la aorta era de origen endógeno, lo que sugiere que la dieta de colesterol con toda probabilidad juega un papel bastante pequeño en la arteriosclerosis en el pollo y que quizás el acetato ó la energía metabólica podría ser investigado como un mejor factor de esta enfermedad.

El contenido en colesterol en sangre y huevos de distintas razas de pollo ha sido estudiado por Shabalina (72) con objeto de establecer posteriores diferencias genéticas que influyen en la capacidad pro

ductora de las aves. Estos estudios se han llevado a cabo en pollos con niveles bajos y normales de catalasa en sangre . También se han estudiado los niveles de colesterol en diferentes tejidos como consecuencia de la alimentación con colesterol (73). En gallos alimentados con una dieta normal el contenido de colesterol de los tejidos es sorprendentemente similar al de los correspondientes tejidos en los mamíferos, excepto un bajo nivel en cerebro de pollo. La hipercolesterolemia en gallos alimentados con colesterol durante dos meses está asociada con un incremento del contenido del colesterol en todos los tejidos excepto en el cerebro , músculo y tejido adiposo. Las gallinas ponedoras con una mínima hipercolesterolemia tienen un contenido bajo en colesterol en la mayoría de los tejidos estudiados, pero las gallinas no ponedoras con una fuerte hipercolesterolemia muestran un contenido en colesterol relativamente moderado en algunos tejidos.

La alimentación es uno de los factores que más influyen en la regulación de la cantidad de colesterol biosintetizado y su contenido en diversos tejidos así como la prevención de enfermedades como la arterioesclerosis. En pollos alimentados con una dieta que contiene un 2% de colesterol durante seis semanas no se afecta el peso corporal ni el de la aorta (74), pero el colesterol en sangre aumenta al doble, al mismo tiempo que la cantidad de colesterol encontrado en la aorta es significativamente mayor. La alimentación con una dieta rica en glúcidos, no afecta a la concentración de colesterol en plasma, aunque este nivel aumenta si a la dieta se añade colesterol (75). En pollos alimentados con una dieta rica en grasas y glúcidos conteniendo también coles-

terol, el nivel de este metabolito en plasma no se afecta aumentando el nivel de triglicéridos (76).

Con objeto de estudiar el efecto de los esteroides vegetales sobre la concentración de colesterol en plasma e hígado, Sklan y col (77) alimentaron pollos con una dieta conteniendo colesterol y aceite de soja encontrando que los esteroides de este aceite disminuían la concentración de colesterol en ambos tejidos. Asimismo estudiaron la influencia de estos esteroides en la absorción y secreción de colesterol y ácidos biliares, viendo que se reducía la absorción de estas sustancias en el intestino. Se ha comprobado asimismo (78) el efecto de los esteroides vegetales sobre el contenido en colesterol de la yema de huevo. Cuando los animales consumen esta dieta la concentración de colesterol de la yema de huevo disminuye significativamente, aunque no varían el tamaño del huevo y de la yema, ni el peso de la cáscara. Tampoco hay diferencias apreciables en la producción de huevos.

Hwang y col (79) han estudiado el efecto de diversas sustancias antihipercolesterolemicas como colestiramina, esteroides de soja, etc, sobre la concentración de colesterol y vitamina A en animales normales e hipercolesterolemicos alimentados con una dieta suplementada con vitamina A ó β -caroteno. Los resultados indican que estas sustancias antihipercolesterolemicas, no solo influyen en los niveles de colesterol y ácidos biliares sino también en los niveles de vitamina A. Estos mismos autores (80) han estudiado el efecto de varios niveles de colestiramina y Sephadex, viendo que a medida que aumenta su concentración en la dieta, mayor efecto producen en los niveles de colesterol y vitamina A.

Uno de los aspectos más interesantes del metabolismo del colesterol, es la producción de hormonas esteroides sexuales y las segregadas por la corteza suprarrenal. En embrión de pollo, los andrógenos se sintetizan tres días antes de la diferenciación morfológica de las gónadas (81). La producción de andrógenos por las gónadas ya diferenciadas comienza a los seis días y medio de la incubación del huevo, siendo los testículos las gónadas de mayor producción seguido por el ovario izquierdo a partir de los nueve días y medio de la incubación.

Kalliecharan y Hall(82) han estudiado los niveles en plasma de embrión de pollo de cuatro hormonas a través del desarrollo. La concentración total de las hormonas progesterona, corticosterona, cortisol y cortisona se incrementa continuamente durante la última mitad del periodo de incubación, disminuyendo después del nacimiento. Ninguna hormona predomina sobre las otras durante el periodo estudiado, pudiendo considerarse que el cambio en la concentración de las hormonas no sigue un modelo común.

Los mismos autores han estudiado los niveles de las mismas hormonas en las glándulas adrenales del embrión de pollo (83). La concentración total de hormonas aumenta hasta el día 15 del desarrollo, disminuyendo después hasta el día 19 y luego vuelve a aumentar hasta el nacimiento. De acuerdo con anteriores trabajos (82) se puede concluir que varias hormonas corticosteroides se sintetizan en las glándulas adrenales y se secretan durante el desarrollo embrionario. En estas experiencias, el cortisol se ha medido usando una técnica radiactiva doble (84).

Boucek y Savard (85) han estudiado la incorporación de acetato en cortes de ovario de Gallus domesticus. El acetato se incorpora a progesterona, androstendiona testosterona y 17 β -estradiol. Estas hormonas se producen en cantidades diferentes según las hembras sean ponedoras o estén en periodo de muda. Las enzimas más activas de este proceso son la Δ^5 , 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Se ha estudiado también la capacidad esteroidogénica de los ovarios en relación con la edad del animal, siendo ésta mayor en pollos de un día que en adultos (86). La comparación de la capacidad esteroidogénica de ovarios y testículos demuestra que la de estos es menor en animales de un día, incrementándose con el desarrollo hasta superar a la de los ovarios en animales adultos. En hembras ponedoras de cinco y siete meses de edad (87) se estudia la formación de hormonas esteroídicas a partir de diversos precursores, indicando los resultados una posible implicación de las vías metabólicas de Δ^5 -C₁₉ en la formación de andrógenos por el ovario de las gallinas ponedoras.

De las enzimas que participan en la biosíntesis del colesterol en pollo se ha estudiado la HMG-CoA sintetasa (88, 89 , 90), viendo su localización en mitocondrias y citoplasma según la síntesis se dirija hacia cuerpos cetónicos ó colesterol, habiendo purificado además tanto la enzima mitocondrial como la citoplasmática. Asimismo la HMG-CoA reductasa de gallinas ponedoras ha sido purificada y caracterizada en 1977 por Beg y col (91) y la prenil-transferasa y su propiedades, han sido es-

tudiadas por King y Rilling (92). En hígado de pollo recién nacido García-Martínez (93) ha estudiado las características de la mevalonato-cinasa y fosfomevalonato cinasa así como su actividad a lo largo del desarrollo de cero a diez días.

1.3. - Importancia del riñón en el metabolismo del MVA

Contrariamente a lo que se creía, Hellström y col (94) demostraron que el riñón es el órgano donde mejor es observado y metabolizado el ácido mevalónico circulante. Esta conclusión la obtuvieron a partir de experiencias en las que seguían una inyección intravenosa de MVA-2-¹⁴C, observando que el riñón convertía aproximadamente cuatro veces más mevalonato a colesterol y precursores del colesterol, que el hígado (94). Además estudios "in vitro" en la corteza renal demostraron que el riñón es más activo en la síntesis de esteroides a partir de mevalonato que ningún otro tejido del cuerpo (95).

Edmand y Fogjak (96) demostraron que en ratas recién nacidas intactas, el MVA-2-¹⁴C inyectado puede servir no solo como un precursor del colesterol sino también como un sustrato para la síntesis de ácidos grasos de larga cadena. Además Fogelman y col (97) administrando MVA-5-¹⁴C "in vivo" observaron que se metabolizaban a ¹⁴-CO₂.

Estos hallazgos han conducido a la hipótesis de la existencia de un desvío de la ruta metabólica que conduce el MVA a la síntesis de esteroides, hacia la formación de aceto-acetato y acetil-CoA que

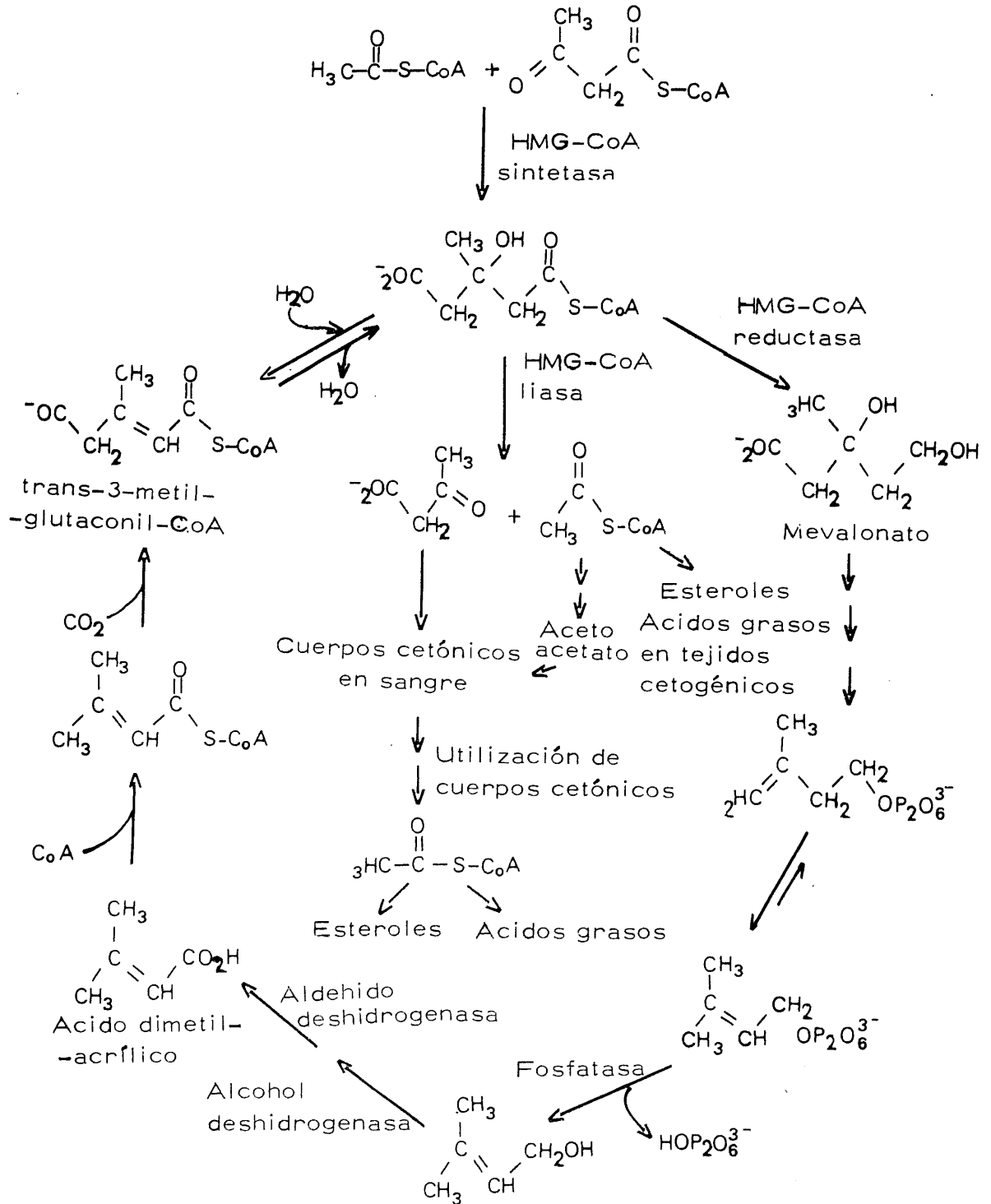
darán lugar a la formación de cuerpos cetónicos y ácidos grasos respectivamente .

De las tres rutas metabólicas que se postulan, la más aceptada (96) es la que da como posible que si la prenil-transferasa (farnesil-pirofosfato sintetasa), que cataliza la síntesis de geranil y farnesil-pirofosfato a partir de 3. 3-dimetilalil e isopentenil-pirofosfato, fuera específicamente inhibida , la acumulación de dimetil-alil-pirofosfato, podría ser metabolizado por una vía que no llevara a la biosíntesis de esteroides. Esto implicaría que el alcohol dimetil-alílico, liberado de la hidrólisis del éster pirofosfato por una fosfatasa del retículo endoplásmico, sería deshidrogenado en dos pasos, a ácido dimetil acrílico (esquema nº 1), el cual después de la conversión a un éster-CoA, sería carboxilado a trans-3-metil-glutaconil-CoA, cuya hidratación generaría 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA. Este esquema tiene intermediarios comunes a la biosíntesis de esteroides a partir de mevalonato y de intermediarios del metabolismo de la leucina.

Con los métodos "in vivo" esta nueva ruta del ácido mevalónico que no lleva a la síntesis de esteroides, llamada "shunt" del mevalonato, solo ha podido ser demostrada de modo significativo en tres tejidos, cerebro, espina dorsal y piel de ratas recién nacidas, (96) pero no ha sido así con las técnicas "in vitro".

Los hallazgos en torno al "shunt" del mevalonato, al menos en tres tejidos de ratas recién nacidas, sugieren la idea de que el

Esquema nº1



Mecanismo hipotético para el reciclaje de los átomos de carbono.

riñón que es el lugar más activo de la síntesis de esteroides a partir del mevalonato circulante, posea también esta vía alternativa.

El trabajo de Edmand y Popjack (96) pudo demostrar, como se cita anteriormente, (el método empleado por estos autores es el de medida de C marcado radiactivamente) que el MVA se incorpora a ácidos grasos de larga cadena. Como consecuencia, la presencia de "shunt" probablemente no puede detectarse por esta técnica en un tejido como el riñón, el cual sintetiza muy pocos ácidos grasos.

Righetti y col (98) con una técnica "in vitro" con la que determinan la conversión de MVA-2-¹⁴C ó MVA-5-¹⁴C a ¹⁴CO₂ en cortes de tejido, además de confirmar los resultados anteriores de que el riñón es el órgano más significativo para la síntesis de esteroides a partir de mevalonato, miden un alto porcentaje de mevalonato metabolizado por el "Shunt" en riñón, ileon, bazo y testículos y con mucha menor cantidad en hígado, cerebro, piel y tejido adiposo. Además, el riñón metabolizaba por la ruta del "shunt" una cantidad de mevalonato 21 veces superior al resto de los tejidos examinados.

Estos resultados hacen ver al riñón como el órgano más importante en el metabolismo de ácido mevalónico por cualquiera de las vías hasta ahora conocidas.

Raskin y Siperstein (95) han estudiado recientemente la incorporación de MVA en distintas partes del riñón de rata. Sus resultados demuestran que la corteza renal es el lugar primario en que se metaboliza el MVA. En el mismo sentido. Edmond y col (99) han puesto de mani-

fiesto en 1976 que la conversión de MVA a escualeno y esteroides "in vivo" en el riñón, tiene lugar casi exclusivamente en los túbulos contorneados proximal y distal de la corteza. Los mismos autores (100) estudian el efecto del $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ sobre el metabolismo del MVA en riñón de rata, habida cuenta de que esta sal produce una necrosis aguda del túbulo proximal. La administración de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ 2-5 horas antes que la inyección de 5- ^{14}C -MVA produce una disminución del 16% en la incorporación de MVA en el riñón y un aumento del 63% en la incorporación de MVA en el hígado. Estos resultados pueden considerarse como la primera expresión bioquímica de mal funcionamiento de los túbulos renales, observable mucho antes que cualquier otra lesión estructural del riñón.

Ya en 1977 se ha estudiado también "in vivo", el significado cuantitativo del riñón en el metabolismo del MVA, comparando el destino del MVA sanguíneo en animales normales y nefrectomizados. Los resultados obtenidos por Wiley y col. (101) ponen de manifiesto, que el "shunt" representa un 26% del metabolismo del MVA en el animal intacto, mientras que la vía de los esteroides representa el 74% restante. Por otra parte, el riñón es el tejido en que mayoritariamente se metaboliza el MVA, tanto a esteroides y sus precursores como -sobre todo- a través del "shunt". En efecto, si bien en los animales nefrectomizados los tejidos extrarrenales pueden asumir el papel del riñón sintetizando esteroides, el "shunt" del MVA resulta disminuido en un 60%. Estos resultados, junto con los mencionados anteriormente, vuelven a señalar importancia del riñón como órgano especializado en el metabolismo del MVA.

1.4. - Importancia del cerebro en el metabolismo del MVA

El componente mayor de la fracción lipídica de la mielina es el colesterol (102, 103). El interés que tiene el metabolismo del ácido meválonico en el sistema nervioso central y por tanto en el cerebro surge de su actuación como precursor de la biosíntesis del colesterol. De hecho se ha estudiado la incorporación de MVA-2-¹⁴C a colesterol, así Chevallier y Gauthereon (104) vieron la importancia de las condiciones de administración del sustrato: intraperitoneal, intracisternal e intraventricular. Ramsey y col. (105, 106) han estudiado la formación de colesterol y otros esteroides por distintas fracciones subcelulares de cerebro de rata a partir de MVA, estableciendo comparaciones entre el proceso "in vivo" e "in vitro".

La distinción de experimentos hechos "in vivo" e "in vitro" es sobre todo necesaria al estudiar la incorporación del MVA a sustancias no esteroídicas. Edmond y Popjack (96) estudian la distribución de lípidos insaponificables y saponificables de los distintos tejidos de ratas de 9 días a las 4, 24 y 72 h después de inyectar subcutáneamente MVA-2-¹⁴C. Del total de la radiactividad del material insaponificable y saponificable, hasta el 33% era de fracción saponificable (ácidos grasos) obtenida de cerebro, espina dorsal y piel. De esta fracción a su vez el 90% se encontraba en el cerebro y espina dorsal, formada por palmítico y esteárico a las 4 h de la inyección.

Este "shunt" del MVA, como ya se señaló en el apartado anterior, solo ha podido ser demostrado por técnicas "in vivo" (96).

El palmítico y esteárico de lípidos del riñón y pulmón llegan a estar marcadas también pero no tan extensamente como en los tres órganos de origen ectodérmico, y los ácidos grasos del hígado no contenían ninguna radiactividad.

En estas experiencias se suele trabajar con animales recién nacidos porque es cuando comienza la mielinización y una intensa actividad sintética en el sistema nervioso central.

Finalmente, es necesario constatar que se ha demostrado la preferencia de el β -hidroxibutirato como sustrato para la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos en experiencias "in vivo" en las que se comparaban el β -hidroxibutirato-3- ^{14}C , aceto-acetato-3- ^{14}C , acetato-2- ^{14}C y mevalonato -2- ^{14}C (107) postulándose el papel que juegan los cuerpos cetónicos en el sistema nervioso central durante la mielinización, no solo como fuente de energía, sino también como sustrato que prestan su esqueleto carbonado a la biosíntesis de lípidos.

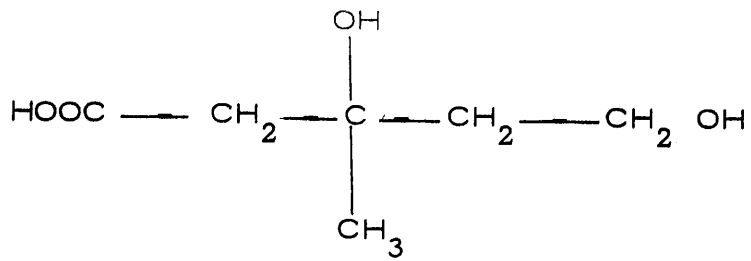
1.5. - Enzimas que catalizan la fosforilación del ácido mevalónico

El ácido mevalónico es convertido en isopentenil pirofosfato mediante tres reacciones (esquema nº 2). La primera de ellas es catalizada por la mevalonato cinasa y da lugar a la formación de P-MVA a partir de MVA. La segunda consiste en la transformación de P-MVA en PP-MVA catalizada por la fosfomevalonato cinasa. La tercera reacción para formar Ip-PP es la única descarboxilación que parece iniciarse por la fosforilación del grupo hidroxilo para suministrar un intermedio trifosforilado del MVA. Esta reacción está catalizada por la pirofosfomevalonato descarboxilasa. La diferencia entre las dos cinasas estriba en que la mevalonato cinasa cataliza la reacción irreversiblemente mientras que la reacción de la fosfomevalonato cinasa puede ser reversible en presencia de un exceso de ADP.

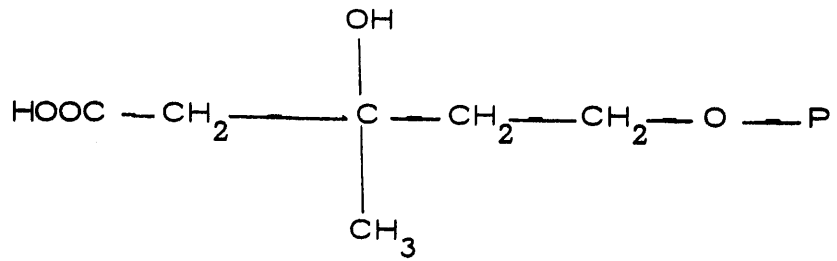
1.5.1. - Mevalonato cinasa

La mevalonato cinasa fue puesta de manifiesto por primera vez en autolisados de levadura (108) y en hígado de rata (109) y posteriormente demostrada en plantas superiores y microorganismos (110).

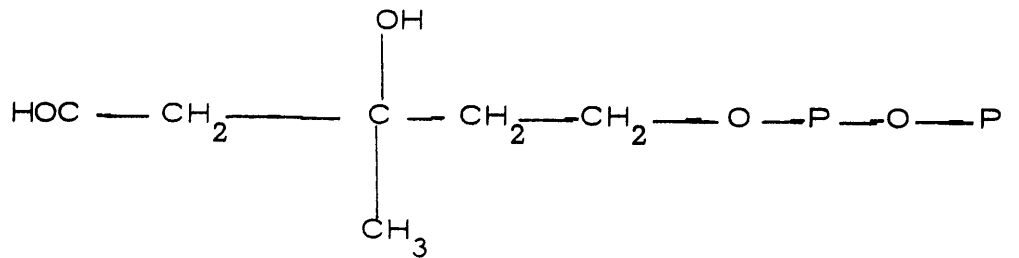
Mediante el empleo de mevalonato cinasa de hígado y ácido mevalónico R y S obtenidos sintéticamente como sustratos, se ha demostrado sin lugar a dudas que la enzima es estereoespecífica para el



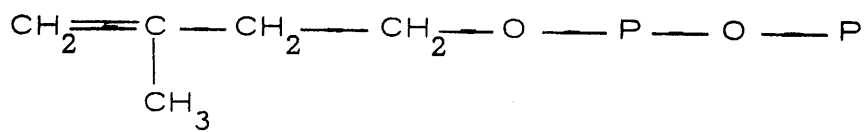
MVA



P-MVA



PP-MVA



Ip-PP

Esquema nº 2

enantiómero \underline{R} (111) y que el producto de la reacción es el \underline{R} mevalonato-5-fosfato levorotatorio (112).

La mevalonato cinasa de hígado de conejo fué purificada y estudiada por Markley y Sma Ilman (113) mediante las siguientes etapas: preparación de polvos acetónicos, precipitación con sulfato amónico, precipitación con sulfato de protamina y cromatografía en columna de DEAE celulosa. La enzima fué purificada unas 100 veces y conservada a -20°C conservaba la mitad de su actividad al cabo de un mes.

A partir de la enzima así purificada estos mismos autores observaron que la K_m para el MVA era $5.1. \times 10^{-3} \text{M}$. El pH óptimo estaba comprendido entre 7.0-8.0. La actividad de la enzima disminuía mediante diálisis frente a agua destilada pero la actividad se conservaba si la diálisis era hecha frente a tampón fosfato y cisteína. La mevalonato cinasa de hígado de conejo requería ATP pero no podía ser sustituido por ADP, GTP, UTP, ó ITP. El Mn^{2+} podía sustituir al Mg^{2+} a bajas concentraciones mientras que el Zn^{2+} ó el Fe^{2+} no podían hacerlo a cualquier concentración. La cisteína también era necesaria para la actividad aunque podía ser sustituida por el β -ME.

El p-cloro mercuribenzoato inhibía casi totalmente la actividad enzimática; esta actividad podía ser restablecida añadiendo cisteína 1 minuto después que el inhibidor.

Estos mismos autores estudiaron la estequiometría de la reacción observando que a partir de una cantidad de MVA se formaban cantidades equivalentes de ADP y P-MVA.

Levy y Popjak (114) estudiando la mevalonato cinasa de hígado de cerdo, encontraron P-MVA y PP-MVA a partir de MVA y ATP. La fosfomevalonato cinasa, enzima que forma el PP-MVA, fué separada completamente de la mevalonato cinasa durante el proceso de purificación de esta última. Mediante precipitación con sulfato de protamina y sulfato amónico (30-45% de saturación) seguida de fraccionamiento con gel de fosfato cálcico, estos autores lograron purificar la enzima unas cien veces y estudiaron sus propiedades demostrando que es una enzima con grupos sulfhidrilos en su centro activo, dada su activación por cisteína en condiciones aeróbicas. La adición de p-cloro mercuribenzoato 1mM produce un 80% de inhibición de la mevalonato cinasa incluso en presencia de cisteína a igual molaridad, pero es revertida por cisteína 20 mM. La iodoacetamida no la inhibe a concentraciones 1 mM y 10 mM.

Los mismos autores estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de ATP como nucleótido coenzimático de la mevalonato cinasa. La concentración óptima de ATP depende de la concentración de iones Mg^{2+} en el medio de incubación. Así en presencia de Mg^{2+} 3mM, la concentración óptima aparente de ATP es de 5.5 mM mientras que con Mg^{2+} 5 mM, el ATP óptimo es 7.8 mM. Por otra parte la mevalonato cinasa de hígado de cerdo no es inhibida por concentraciones mayores a 8mM de ATP. La relación óptima ATP/Mg^{2+} fué de 1.5-2. Otros

nucleótidos (ADP, CTP, GTP, e ITP) fueron probados como posibles sustituyentes del ATP, a una concentración de 7.4 mM en presencia de Mg^{2+} 5 mM; solo el ITP pudo reemplazar al ATP formandose una cantidad de P-MVA casi idéntica a la lograda en presencia de ATP. En las experiencias realizadas con extractos crudos se añade FNa para inhibir la actividad adenosintrifosfatasa.

La mevalonato cinasa de hígado de cerdo requiere un ión metálico divalente para su activación. El ión Mg^{2+} muestra esta acción hasta una concentración de 4 mM a partir de la cual decrece en la misma. Los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , este último con menos efectividad, pueden sustituir al Mg^{2+} . El pH óptimo de la enzima se situa en 7.3 habiendose ensayado entre los márgenes de 6.0-8.7. La especificidad de la enzima es muy estrecha ya que no puede fosforilar a varias sustancias relacionadas con el MVA; es activa solo frente a uno de los enantiómeros del DL-MVA. El farnesoato potásico y más concretamente la sal de su análogo saturado el 3,7,11 trimetildodecanoato inhiben la mevalonato cinasa de este origen.

Levy y Popjak han estudiado asimismo la influencia de la concentración de sustrato sobre la mevalonato cinasa de hígado de cerdo demostrando que la máxima velocidad se alcanza a concentración 2 mM de MVA calculando una constante de Michaelis aparente de 50 mM para el isómero natural.

Dorsey y Porter (115) purificaron la mevalonato cinasa de hígado de cerdo con gel de fosfato cálcico. Posteriormente someten la muestra a un fraccionamiento en columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón fosfato 0.01 M, pH 7.5. La mevalonato cinasa se eluye con tampón fosfato 0.1 M y es precipitada con sulfato amónico al 50% de saturación. El precipitado se disuelve en un volumen mínimo de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 y se dializa durante una noche frente a 500 volúmenes del mismo tampón. Posteriormente el dializado es fraccionado en columna de Sephadex G-200 equilibrada con el mismo tampón de la diálisis y eluida a una velocidad de 2 ml por hora. Esta preparación no contiene fosfomevalonato cinasa y es estable al menos durante seis semanas a 4°C.

Los mismos autores han demostrado que la mevalonato cinasa de hígado de cerdo es inhibida por geranil puro, fosfato y farnesil pirofosfato. Ambos ésteres fosfóricos a una concentración 2mM producen una inhibición del 50%. El hecho de que los precursores del farnesil pirofosfato, Ip-PP y DMAPP no la inhiban significativamente a la misma concentración, indica que la inhibición es completamente selectiva. Sin embargo a mayores concentraciones el Ip-PP (0.5mM) y el DMA-PP (0.59 mM) inhiben un 27% y 57% respectivamente. El pirofosfato inorgánico (0.1 mM) produce asimismo una inhibición del 28% sobre la mevalonato cinasa. Del hecho de que el farnesil no fuera inhibidor de la enzima (114) parece deducirse que la especificidad de la inhibición no depende de la fracción de pirofosfato ni de la fracción terpenil por separado, sino más bien de un terpenil pirofosfato de longitud de cadena definida. Estudios cinéticos sobre esta inhibición han demostrado que tanto el F-PP

como el G-PP inhiben incompetitivamente a la mevalonato cinasa cuando el sustrato variable es el MVA, mientras que lo hacen competitivamente cuando lo es el complejo $Mg-ATP^{2-}$. Estos datos, junto a los de Benedict y col (116) y Holloway y Popjak (117) sobre la síntesis del F-PP parecen indicar que las concentraciones de G-PP y F-PP que son usadas eficientemente por las enzimas específicas en la síntesis del colesterol, son también concentraciones que pueden ejercer una influencia reguladora sobre la actividad mevalonato cinasa. Sin embargo el significado "in vivo" de esta inhibición "feed-back" aún no se conoce.

En 1970 Flint (118) estudió la actividad y propiedades cinéticas de la mevalonato cinasa de ovario de ratas superovuladas, poniendo de manifiesto ciertas diferencias respecto a la misma enzima de hígado. El pH óptimo de la enzima de ovario está comprendido entre 7.0 y 7.5. La enzima requiere Mg^{2+} para su actividad, que permanece inalterada tras el tratamiento con hormona luteinizante "in vivo". La preparación parcialmente purificada tiene una constante de Michaelis para el D, L-MVA de 3.6 mM en presencia de $Mg-ATP^{2-}$ 2mM y una Km para el ATP de 120mM en presencia de D.L-MVA 1 mM. Estas constantes difieren de las mencionadas anteriormente para la enzima hepática (114) si bien la diferencia puede deberse a la utilización de preparaciones enzimáticas de distinto grado de purificación. Por otra parte, mientras que la enzima de hígado de cerdo y de rata activada por cisteína o glutatión, la de ovario de rata superovulada no es. En cambio en todos los casos tanto el geranil como el farnesil pirofosfato

actúan como inhibidores pero no el Ip-PP ni el DMA-PP. En el caso de la enzima de ovario, el fosfomevalonato actúa como un potente inhibidor de la propia enzima que cataliza su biosíntesis, la mevalonato cinasa.

Beytia y col (119) han purificado y estudiado el mecanismo de acción de la mevalonato cinasa de hígado de cerdo. El procedimiento seguido para la purificación es el de Dorsey y Porter (115) con algunas modificaciones. Consiste en una precipitación con sulfato amónico entre el 15-40 % de saturación del sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$ de un homogenado hepático hecho con tampón fosfato 0.1M, pH 7.5 con β -ME 10 mM EDTA 1 mM. El precipitado obtenido es dializado, tratado con gel de fosfato cálcico y precipitado de nuevo con sulfato amónico entre el 0-50% de saturación. Después se somete a cromatografía en columna de DEAE-celulosa, precipitación con sulfato amónico (0-60% de saturación) y filtración por gel de Sephadex G-200. La proteína enzimática eluida es absorbida de nuevo en columna de DEAE-celulosa, concentrada por precipitación con sulfato amónico (0-60% de saturación) y eluida en columna de Sephadex G-150. De esta manera se logra una purificación de unas 600 veces. La proteína enzimática es homogénea por electroforesis en gel de acrilamida, centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, electroenfoque y filtración por gel Sephadex.

La mevalonato cinasa de hígado de cerdo pierde un 70-80% de actividad cuando se conserva 10 días a 4°C en ausencia de β -ME o de DTT. Se obtiene una parcial recuperación de la actividad me-

diante incubación con DTT 10 mM durante 1 hora a 38°C. Cuando el β -ME se adiciona en todos los pasos de la purificación se mantiene la actividad durante un mes a 4°C sin pérdida significativa.

La enzima tiene un punto isoelectrico de 4.7 unidades de pH. Durante el proceso de electroenfoque hay un considerable cambio en la conformación de la proteína enzimática que se traduce en una elevada pérdida de la actividad enzimática debida probablemente al pH, ya que pierde también su actividad cuando se somete a diálisis en tampón acetato 5 mM pH 4.7 durante un mismo periodo de tiempo, si es sometida a una diálisis similar frente a un tampón pH 7.0.

De acuerdo con el comportamiento de la enzima frente al Sephadex G-100 se ha calculado un peso molecular aproximado de 98.000, mientras que por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa el peso molecular calculado es de 90.000.

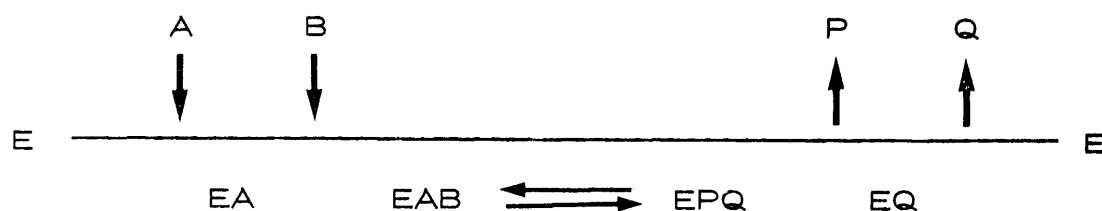
El análisis espectrofotométrico de la actividad mevalonato cinasa de hígado de cerdo ha puesto de manifiesto que la enzima requiere iones metálicos divalentes para su activación. A bajas concentraciones (1-10 mM) el Mn^{2+} es mejor activador que el Mg^{2+} lográndose la máxima actividad a 5 mM aproximadamente. A mayores concentraciones el Mn^{2+} es inhibidor. El Mg^{2+} actúa como mejor activador a concentraciones superiores. A concentraciones similares el Ca^{2+} no presenta capacidad activadora alguna.

Los inhibidores de grupos -SH como el p-hidroximercuribenzoato y la monoido acetamida inhiben la mevalonato cinasa de este origen. La inhibición puede ser revertida por adición de MVA ó de ATP a la mezcla de la incubación. Al contrario, al isopropil fosfluorhidrato que se une a los restos de serina no inhibe la mevalonato cinasa ni a una concentración 1 mM. De estos resultados puede deducirse que al menos un grupo-SH es esencial para la actividad de la enzima

Las constantes cinéticas de la enzima de hígado de cerdo son las siguientes: Km para el MVA, 1.86×10^{-5} M; Km para el $MgATP^{2-}$ 3.02×10^{-4} M. La constante de disociación para el MVA es 4.66×10^{-6} M. Cuando el P-MVA se encuentra presente en el medio de incubación se obtiene una inhibición no competitiva con el $MgATP^{2-}$ o el ATP como sustratos variables. Se observa casi una inhibición incompetitiva cuando la enzima está saturada con $MgATP^{2-}$. El ADP es un inhibidor competitivo de la mevalonato cinasa si el sustrato variable es el MVA.

A partir de una serie de estudios sobre la velocidad inicial de la reacción y sobre la inhibición por producto (P-MVA) y por metabolitos superiores Beytia y col. han llegado a la conclusión de que la fosforilación del MVA, catalizada por la mevalonato cinasa, es secuencial. Ya Dorsey y Porter (115) habían sugerido una actuación de este tipo teniendo en cuenta la inhibición por G-PP y F-PP; los estudios de Beytia lo han confirmado. Según este último todos los sustratos tienen que reaccionar con la enzima antes que el primer producto sea separado. El MVA reaccio-

na con la enzima en primer lugar seguido por el MgATP^{2-} y el orden de eliminación de los productos es primero el P-MVA y luego el ADP según el diagrama siguiente:



donde A y B son MVA y MgATP mientras que P y Q son P-MVA y ADP respectivamente.

Goodfellow Barnes (120) han aislado la mevalonato cina de larvas de mosca Sarcophaga bullata y han demostrado por primera vez la presencia de esta enzima en insectos.

En estos invertebrados se considera que no ocurre la biosíntesis de esteroides aunque parece que tiene lugar la de otros derivados isoprenoides como las ubiquinonas y hormonas juveniles. El procedimiento de aislamiento parte del sobrenadante de la centrifugación a $23.000 \times g$ durante 20 minutos de los homogenados obtenidos de larvas de Sarcophaga en tampón fosfato 0.1 M pH 7.1 conteniendo DTT 0.3 mM. Este sobrenadante se precipita con sulfato amónico entre el 30-60% de saturación, redisolto en el mismo tampón y dializado durante 4 horas frente a 40 volúmenes del tampón con EDTA 1.0 mM. El material dializado es precipitado con sulfato de protamina y el sobrenadante de nuevo precipitado con sulfato amónico entre el 35-55% de saturación. El precipitado es redisolto de nuevo y fraccionado en columna de Sephadex G-200 previamente equilibrada

con el tampón anterior y eluida con el mismo tampón. La fracción activa de mevalonato cinasa es aplicada a una columna de DEAE-Sephadex A-50 y eluida con un gradiente de ClK. El grado de purificación logrado al final del proceso es de 110 veces. La preparación es homogénea en electroforésis en gel de poliacrilamida.

La mevalonato cinasa así obtenida de larvas de Sarcophaga bullata tiene un peso molecular de 113.000 y una constante de Michaelis aparente para el MVA de 6.2×10^{-4} M y de 4.7×10^{-3} M para el ATP. La enzima muestra una activación óptima por Mn^{2+} a una concentración de 1.8 mM y por Mg^{2+} 7.1 mM. Concentraciones superiores de Mg^{2+} no afectan significativamente a la actividad de la enzima mientras que las concentraciones mayores que la óptima de Mn^{2+} son inhibitoras. A las concentraciones óptimas respectivamente la mevalonato cinasa es un 60% más activa en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . Aunque la enzima se caracteriza por una marcada preferencia por el ATP como nucleótido coenzimático, el ITP y el UTP pueden ser usados también a pequeña concentración (1.2 mM). El ITP no puede sustituir completamente al ATP. Por otra parte el ADP ensayado en un amplio margen de concentración no reemplaza los requerimientos en ATP si bien tampoco se ha demostrado ninguna inhibición en condiciones normales de inhibición. Asimismo tampoco se ha puesto de manifiesto la presencia en la fracción G-200 de la enzima de actividad nucleósido difosfato cinasa ya que no hay formación aparente de P-MVA en presencia de ADP y GTP ó CTP

La enzima de este origen no es sensible a la activación aeróbica por cisteína o glutatión pero es inhibida por p-cloro-mercuribenzoato, N-etil maleimida y iodoacetamida, inhibición que es de diferente amplitud de acuerdo con el inhibidor y la concentración ensayadas. El pH óptimo observado es de 7.2.

Barnes y Goodfellow (121) han estudiado también la localización y la variación de la actividad mevalonato cinasa durante el desarrollo de las larvas de Sarcophaga bullata así como el efecto de los esteroides de la dieta sobre la enzima de este origen (122) y la influencia de la presencia o ausencia de gérmenes en el medio de cultivo.

Slakey y col. (21) han estudiado los efectos del ayuno, la realimentación y el ritmo diurno sobre la mevalonato cinasa de hígado de rata dentro del conjunto de enzimas que catalizan la conversión de 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA a escualeno.

Estos autores han encontrado que la mevalonato cinasa no varía la actividad durante el ayuno ni con la realimentación a las 72 horas de haber comenzado el ayuno. Tampoco exhibe ritmo diurno después de la realimentación.

Si bien Dorsey y Porter (115) habían estudiado la inhibición de la mevalonato cinasa de hígado de cerdo por F-PP y G-PP, esta inhibición no parece probable que sea la causa de la inhibición de la síntesis de colesterol a partir de MVA (21) ya que Slakey y col. han observado que la síntesis de F-PP se incrementa durante la realimentación y

la recuperación observada en la conversión de MVA a escualeno después de la realimentación, es más rápida que la observada en la actividad dimetilalil transferasa.

Más adelante Slakey y col. (11) investigaron las enzimas que convierten el acetil CoA en escualeno en aorta de cerdo estudiando en conjunto la conversión de ácido mevalónico en isopentenil pirofosfato con el P-MVA, PP-MVA como metabolitos intermedios usando extractos procedentes de la precipitación con sulfato amónico entre 15-60 % de saturación.

Estudiaron este proceso añadiendo al sistema de incubación FK para inhibir las fosfatasas y iodoacetamida para inhibir la isopentenil pirofosfato isomerasa.

La formación de fosfomevalónico por este sistema enzimático aumenta al 100 % cuando se suprime la adición de FK lo que está de acuerdo con los resultados de Rodríguez y Leal (26) que encontraron que la conversión de ácido mevalónico en colesterol se inhibía por la presencia de FK.

Ramachandran y Shah (6) han estudiado la fosforilación del ácido mevalónico y su posterior descarboxilación en hígado de ratas lactantes y destetadas. La formación de P-MVA es igual en ambos casos, mientras que la formación de Ip-PP es de 5-20 veces mayor en ratas destetadas. También han estudiado el efecto de la alimentación con una dieta con 1 % de colesterol encontrando que la formación de P-MVA no varía mientras que la síntesis de Ip-PP disminuye un 50-80 %, deduciendo de estos datos que la descarboxilación de PP-MVA es un punto de control en la síntesis del colesterol.

En microorganismos Ohnoki y col (123) han estudiado la biosíntesis del fitoeno en Staphylococcus identificando el P-MVA como primer producto del metabolismo del MVA y aislando la mevalonato cinasa de este origen. La identificación del P-MVA la hacen por radiocromatografía en papel empleando diferentes líquidos de desarrollo dada la variabilidad de los valores Rf observados. La mevalonato cinasa de Staphylococcus requiere ATP y Mn^{2+} para su actuación. La enzima conserva su actividad durante varias semanas si se mantiene congelada.

Cooper y Benedict (110) han estudiado la mevalonato cinasa de Euglena gracilis encontrando que es necesario la presencia de ATP y Mg^{2+} para la actividad de la enzima así como el glutatión, aunque la ausencia de este último solo disminuye la actividad mevalonato cinasa un 40% aproximadamente. Estos autores estudiaron asimismo la influencia del tiempo de incubación y de la concentración de proteínas sobre la actividad de la enzima. La constante de Michaelis aparente para el DL-MVA es 6×10^{-5} M y para el ATP de 6×10^{-3} M. La enzima es drásticamente inhibida por concentraciones de ATP superiores a 15 μ moles/ml. Esto puede ser debido a que a estas concentraciones de ATP la relación ATP/Mg^{2+} excede de la unidad.

Los mismos autores no han podido detectar mevalonato cinasa en algas verdes-azuladas y bacterias fotosintéticas, lo cual puede estar en relación con el hecho de que estos microorganismos solo contienen carotenos, mientras que la actividad mevalonato cinasa si es observable en organismos que contienen esteroides y carotenos como las plantas superiores.

Green y Baisted (124) han descrito un método para la determinación de la mevalonato cinasa de semillas de Pisum sativum.

La preparación enzimática consiste en el sobrenadante de la centrifugación a 40.000 g de un extracto crudo de semillas de guisante obtenido en tampón fosfato 0.1 M pH 6.8 conteniendo Mg^{2+} 0.01 M, glutatión 0.01 M y sacarosa 0.45M. La determinación de la actividad se basa en la desaparición de MVA-2 ^{14}C con condiciones en que la cinética es de primer orden respecto al sustrato. El MVA residual es separado mediante una modificación de la técnica de Porter para el aislamiento de la mevalonato lactona (125). Por otra parte los derivados fosforilados del MVA fueron separados e indentificados mediante cromatografía en DEAE-celulosa (126) y posterior cromatografía en papel, cromatografía en columna de Dowex-formiato(127) o por hidrólisis ácida y evaporación de los componentes volátiles para la determinación de derivados alílicos (128) . Mediante estos métodos demostraron que la distribución de la radioactividad al final de la reacción para la siguiente: MVA (68%), P-MVA (6-7%) PP-MVA (9-10%), Ip-PP(4-5%) DMA-PP (11%) e Ip-P(1%) . No fué puesto de manifiesto ningún alilpirofosfato ni fostato superior al DMA-PP.

Más recientemente Green y Baisted (129) han estudiado las actividades enzimáticas implicadas en la conversión de ácido mevalónico en escualeno durante las primeras etapas de la germinación de semillas de Pisum sativum y han encontrado que en términos absolutos la mevalonato cinasa es la más activa de las enzimas del metabolismo isoprenoide. Estos

autores han demostrado que la actividad mevalonato cinasa es máxima a los cuatro horas de germinación, disminuyendo ligeramente con posterioridad sin que exista dilución con otras proteínas inactivas. El pH óptimo de la mevalonato cinasa es de 7.3.

En el latex de Hevea brasiliensis, Williamson y Kekwick (130) pusieron de manifiesto la formación de P-MVA a partir de MVA por la mevalonato cinasa, en un primer trabajo sobre las enzimas que participan en la biosíntesis del caucho.

La purificación de la enzima la llevan a cabo precipitando en primer lugar a pH 4.5 con lo que eliminan gran cantidad de proteínas acompañantes. La precipitación con sulfato amónico o con disolventes orgánicos como el etanol o la acetona no produjo aumento alguno de la actividad específica. El sobrenadante de la precipitación ácida dializado frente a tampón fosfato 0.02 M pH 6.0 es aplicado a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con este tampón; muy poca proteína y ninguna actividad mevalonato cinasa es eluida con un gradiente de ClK hasta una concentración 1.0M. Similares resultados se encontraron en experimentos paralelos realizados a pH 7.5. Aunque la absorción en gel de fosfato cálcico había sido utilizada con éxito en la purificación del enzima de hígado de cerdo (114), la enzima de Hevea presente en el sobrenadante ácido no puede ser eluida con éxito de las columnas de hidroxilapatito. Sin embargo se obtienen buenos rendimientos cuando el sobrenadante de la precipitación a pH 4.5 es aplicado a una columna de Sephadex G-200 en tampón fosfato 0.05 M pH 7.5. La elución con este tampón originó una fracción activa en la que estaba contenida en 91 % de la proteína aplicada.

Experimentos llevados a cabo en columna de DEAE-Sephadex A-50 demostraron que alrededor del 95% de la actividad enzimática podía eluirse con solución de ClK en un gradiente de concentración. A continuación la enzima fue concentrada por ultrafiltración, dializada y aplicada a una segunda columna de DEAE-Sephadex A-50 a pH 6.0. de esta manera se consiguió una purificación de unas 160 veces. El examen cromatográfico solo demuestra la existencia de P-MVA pero no de PP-MVA: lo cual sugiere la ausencia de fosfo-mevalonato cinasa en el purificado.

Las propiedades de la mevalonato cinasa de Hevea fueron estudiadas por Williamson y Kekwick utilizando el primer eluido de la columna de DEAE-Sephadex A-50. La K_m para el MVA resultó ser 0.13 mM y para el ATP 2 mM. En cuanto a la especificidad de los nucleótidos, el ITP es tan activo como el ATP a similares concentraciones y el único nucleótido activo fue el UTP si bien con una menor efectividad. Los nucleótidos CTP y GTP eran inactivos. Tampoco puede utilizarse el ADP como agente fosforilante. Empleando como preparaciones enzimáticas el suero de latex reconstituido demostraron que la mevalonato cinasa era activada por Mg^{2+} y Mn^{2+} siendo el Mn^{2+} 1mM el que produce la máxima activación en presencia de ATP 6 mM. El Mg^{2+} produce una activación menor que el Mn^{2+} alcanzándose su máximo a concentración 4 mM. A concentraciones superiores a las consideradas anteriormente como óptimas, ambos iones producen inhibición siendo ésta más pronunciada con el Mn^{2+} . De los restantes iones ensayados solo el Ca^{2+} produce una ligera activación; el Co^{2+} , Fe^{2+} y Ba^{2+} no tenían prácticamente ningún efecto. El pH óptimo fue de 7.5 si bien la enzima era estable durante 1 hora a 30°C en un margen de

pH comprendido entre 4.5 y 9.0. La mevalonato cinasa de Hevea no es activada por cisteína ó glutati3n al contrario que la enzima de h3gado de cerdo. Sin embargo la enzima es sensible a los reactivos bloqueantes de grupos -SH: la N-etil maleimida a una concentraci3n 10 mM produce un 100% de inhibici3n, mientras que la iodoacetamida a la misma concentraci3n solo produce una inhibici3n del 15 %. Los iones Zn^{2+} (10 mM) producen una inhibici3n del 96%.

Posteriormente Chesterton y Kekwick (131) han investigado la formaci3n de Ip-P e Ip-PP a partir de MVA en Hevea brasiliensis observando que el producto inicialmente formado era el P-MVA.

La formaci3n de derivados fosforilados del MVA en pino fu3 puesta de manifiesto por Valenzuela y col. (132). Las ac3culas aisladas de Pinus radiata incorporan la radiactividad del ortofosfato en ATP, PP-MVA el Ip-PP mientras que la radiactividad del MVA aparece en 3stos dos 3ltimos compuestos y en P-MVA cuando se utiliza como material enzimático un extracto libre de c3lulas de plántulas del mismo origen. Estos extractos contienen una fosfatasa muy rica que rompe el ATP, el ADP y varios fosfomono3steres. La adici3n de FNa 0.03 M inhibe la actuaci3n de la fosfatasa permitiendo el ac3mulo de derivados fosforilados especialmente de los alil pirofosfatos. La pequeña cantidad de PP-MVA puesta de manifiesto por estos autores, puede deberse a una rápida descarboxilaci3n a Ip-PP en comparaci3n con una más lenta fosforilaci3n del P-MVA.

En estudios posteriores, Valenzuela y col. (133) pudieron demostrar la presencia de mevalonato cinasa en extractos libres de células de plántulas de Pinus radiata. La enzima está presente en la fracción acuosa puesto que la centrifugación a $34.000\times g$ ó a $170.000\times g$ durante 2 horas no afecta a la actividad del líquido sobrenadante. La enzima puede ser concentrada con sulfato amónico al 55% de saturación si bien con ello no se logra ningún incremento de la actividad específica. La máxima actividad se logra con tampón Tris-maleato pH 6.0; la adición de Mn^{2+} 3mM con ATP 23.5 mM produce un máximo de actividad la cual disminuye fuertemente al aumentar la concentración de ión metálico. El EDTA produce una inhibición casi total. Este comportamiento es muy parecido al de la enzima de Hevea y la de hígado. Cuando la enzima se estudia en diferentes periodos de tiempo de incubación la cantidad máxima incorporada es solo del 50% incluso al cabo de 4 horas lo cual parece demostrar la especificidad de la enzima hacia un enantiómero del MVA.

Trabajando con extractos libres de células de P. radiata Beytia y col (134) observaron que alrededor del 1% de la radiactividad del MVA quedaba retenida en las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético. Este fenómeno requería por otra parte la presencia de ATP, iones Mn^{2+} y grupos -SH libres y tenía lugar asimismo mediante precipitación con sulfato amónico al 80% de saturación. La interpretación más lógica consiste en el establecimiento de una unión no covalente a algunos intermediarios biosintéticos superiores ya que el n-butanol extrae el 92% de la radiactividad del precipitado correspondiente principalmente a los prenoles de 15 átomos de carbono.

En Pinus pinaster García Peregrín (135) demostró la incorporación del MVA a derivados fosforilados por plántulas de 20-100 días en presencia de ATP 8 mM, Mg^{2+} 4 mM y Mn^{2+} 4mM. Asimismo (136) estudió la influencia de algunos efectores de grupos -SH sobre el comportamiento de las enzimas fosforilantes del MVA en extractos libres de célula de P. pinaster. El glutatión tiene un efecto marcadamente favorable sobre la formación de P-MVA así como sobre la formación de PP-MVA e Ip-PP especialmente cuando actúa a concentración 10 mM y algo menos fuerte a concentración 1 mM. Un efecto similar aunque menos acusado presenta cisteína. Entre los compuestos que bloquean los grupos -SH, García Peregrín estudió el efecto de la iodoacetamida, p-hidroximercuribenzoato y etilmaleimida. La iodoacetamida 10 mM inhibe casi completamente a la mevalonato cinasa mientras que a una concentración de 1 mM la inhibición es mucho menor. El glutatión, adicionado a una concentración 1.6 mM, contrarresta la inhibición producida por la iodoacetamida 1 mM y reduce bastante el efecto de la iodoacetamida 10 mM. El p-hidroximercuribenzoato presenta un débil efecto a una concentración 0.01 mM pero produce una completa inhibición de las enzimas estudiadas cuando actúa a una concentración 1 mM. La presencia de glutatión 1.6 mM no evita esta inhibición pero sí la ejercida por el p-hidroximercuribenzoato a 0.01 mM. La etilmaleimida es algo menos efectiva a concentración 0.01 mM, pero también inhibe completamente a la mevalonato cinasa a concentración 1 mM. Esta inhibición es contrarrestada por la presencia de glutatión 1.6 mM.

Suarez (137) demostró que los extractos obtenidos a partir de polvos acetónicos de semillas de Pinus pinaster conservan la actividad mevalonato cinasa durante varias semanas a 4°C. El pH óptimo

de la enzima fué de 7.8-8 que difiere del de la mevalonato cinasa de P. radiata (133) siendo similar a los de hígado de cerdo (114), ovario de rata superovulado (118) , latex de Hevea (130) y larvas de S. bullata (120).

El ATP fué el nucleótido más efectivo pára fosforilar el MVA en extractos libres de células de semillas de P. pinaster; no así el ADP, GTP, UTP e ITP a las mismas concentraciones.

Tampoco se encontró actividad nucleótido difosfato cinasa puesto que el GTP, UTP e ITP fueron incapaces de formar P-MVA a partir de MVA en presencia de ADP. La mevalonato cinasa de este mismo origen fué capaz de fosforilar el MVA incluso en ausencia de ión metálico divalente. La adición de Mn^{2+} 10 mM produce una inhibición de un 50% en la enzima mientras que el Mg^{2+} a la misma concentración produce solo una pequeña inhibición. La adición de EDTA 10 mM produce una completa inhibición en la enzima. Cuando los extractos dializados durante 30 min. 1 h ó 2 h, se redujo fuertemente la capacidad de la mevalonato cinasa para fosforilar el MVA mientras que la adición de Mg^{2+} 5-10 mM incrementó ligeramente la formación de P-MVA. Resultados similares se encontraron usando extractos de polvos acetónicos.

La Km de la mevalonato cinasa de P. pinaster para el MVA fué de 8×10^{-5} M para ATP 8 mM y la Km para el ATP 1.4×10^{-4} M para MVA 5.7×10^{-5} M.

La mevalonato cinasa de este origen fué parcialmente purificada partiendo del extracto del polvos acetónicos seguida de una precipitación con sulfato de protamina en la que apenas se obtuvo purificación

al contrario que con la enzima de hígado de cerdo (114). Alrededor del 80% de la enzima fué precipitada con sulfato amónico entre 30-45% de saturación. Este precipitado redisolto fué eluido en una columna de Sephadex G-1000 obteniéndose dos fracciones con actividad mevalonato cinasa (138) la segunda de las cuales perdía rápidamente la actividad. La primera fracción activa fué inyectada en una columna de DEAE-Sephadex A-50 no obteniéndose incremento de la actividad específica.

La mevalonato cinasa de extractos obtenidos a partir de polvos acetónicos de Agave americana es activada por glutatión o por β -mercapto-etanol 10 mM lográndose un fuerte incremento de la formación de P-MVA cuando el β -mercaptoetanol es adicionado al tampón para la preparación del extracto, actuando en este caso como protector de la enzima durante todo el proceso de manipulación e incubación (139).

Otras características de la mevalonato cinasa de Agave americana han sido estudiadas por Suarez (140). Como en la enzima de P. pinaster el ATP fué el dador de fosfato más efectivo a concentración 1 mM y 5 mM, no pudiendo ser suplantado por el ITP, GTP ó UTP a las mismas concentraciones. El pH óptimo resultó ser 7.9.

Asimismo la mevalonato cinasa de extractos obtenidos de polvos acetónicos de hojas de A. americana fué capaz de formar P-MVA a partir de MVA en ausencia de los iones metálicos divalentes. La adición de Mg^{2+} 10 mM aumenta fuertemente la fosforilación del MVA mientras que el Mn^{2+} a la misma concentración produce inhibición. El mismo efecto se observó con extractos dializados.

La mevalonato cinasa del mismo origen parcialmente purificada alcanzó su máximo de actividad en presencia de Mn^{2+} 2 mM o de 6-8 mM de Mg^{2+} . Concentraciones más altas de Mn^{2+} inhiben fuertemente la actividad de la enzima mientras que mayores concentraciones que las óptimas de Mg^{2+} solo producen una ligera inhibición.

La K_m de la mevalonato cinasa de extractos de polvos acetónicos de hojas de A. americana fué 0.05 mM para el MVA en presencia de una concentración de ATP 8 mM mientras que la K_m para el ATP fué 0.14 mM con una concentración de MVA 0.057 mM.

La mevalonato cinasa de este mismo origen fué parcialmente purificada a partir de polvos acetónicos de hojas. Estos extractos fueron precipitados con sulfato amónico entre 30-45 % de saturación. La posterior elución en una columna de Sphadex G 100 dió dos fracciones activas (138) y al igual que en P. pinaster (137) la segunda fracción perdió rápidamente la actividad mevalonato cinasa. La primera fracción activa fué eluida en una columna de DEAE-Sephadex A-50 y a continuación de nuevo por una columna de Sephadex G-100. En experiencias paralelas la primera fracción activa de la columna de Sphadex G-100 fué aplicada a una columna de DEAE-celulosa no obteniéndose aumento apreciable de la actividad específica de la mevalonato cinasa.

La formación de P-MVA por extractos libres de células de batatas inyectadas con la podredumbre negra (Ceratosis fimbriata) ha sido demostrada por Oshima-Oba y Uritani (141) a partir de MVA- ^{14}C . Tanto

la mevalonato cinasa como las otras enzimas implicadas en la biosíntesis del Ip-PP necesitan la presencia de iones Mg^{2+} para su actuación alcanzándose un óptimo en la producción de Ip-PP en presencia de Mg^{2+} 5 mM. La actividad de los sistemas enzimáticos estudiados es mayor en tejidos infectados por el hongo que en los sanos o en los cortes de tubérculos.

Potty y Bruemmer (142) han puesto de manifiesto la existencia de las enzimas que fosforilan el MVA en las vesículas de zumo de fruto de la naranja mediante la identificación de P-MVA y PP-MVA como productos de la reacción. Estos dos derivados fosforilados fueron los únicos observados. La adición de una polivinilpirrolidona (Polycar AT) y de ascorbato sódico al medio de extracción produjo preparaciones enzimáticas con actividades específicas superiores. El extracto así obtenido es precipitado con sulfato amónico al 90 % de saturación suspendido en tampón Tris 0.1 M pH 7.0 y dializado frente a agua destilada a 4°C durante 2 horas. El tratamiento de la solución dializada con resinas tipo Dowex incrementó la actividad específica de la preparación.

La máxima incorporación de MVA por estas preparaciones de naranja ocurre a las 3 horas disminuyendo posteriormente la cantidad de derivados fosforilados del MVA formados. Esta disminución es debida probablemente a la fosfatasa presente en el extracto. A las 3 horas, la actividad de la fosfatasa es superior a la de la mevalonato cinasa. Por otra parte la máxima fosforilación del MVA tiene lugar a pH 6.5. La concentración óptima de ATP es 7.5 mM en presencia de Mg^{2+} 10 mM; niveles superiores de ATP producen una ligera inhibición de la mevalonato cinasa posiblemente por captación de los iones Mg^{2+} . La reacción es específica para el

ATP; el UTP ó el CTP no pueden reemplazarlo como nucleótidos fosforilantes. La mevalonato cinasa de naranja requiere agentes reductores para su máxima actividad específica como se pone de manifiesto por el incremento de la actividad observada en presencia de glutatión, mercaptoetanol y ditioneitol. La inhibición por iodoacetamida sugiere que al menos un grupo tiólico de la enzima puede participar en el centro activo. El FK incrementa la cantidad de derivados fosforilados del MVA presentes en el medio, posiblemente a través de la inhibición de la fosfatasa que los hidrolizaba.

Gray y Kekwick (143) han estudiado la inhibición de la mevalonato cinasa de Hevea brasiliensis, Cucumis melo, Phaseolus vulgaris y Saccharomyces cerevisiae por geranyl pirofosfato, farnesil pirofosfato, geranylgeranyl pirofosfato y fitil pirofosfato. La enzima de Hevea fué purificada por el método de Williamson y col (130), la de Phaseolus por el de Gray y col (144) y la de levadura, según Tchen (108). Para la purificación de la mevalonato cinasa de cotiledones de Cucumis melo se preparó una suspensión en tampón fosfato 0.08 M y pH 7.0 y se centrifugó a $105.000 \times g$ durante 60 minutos a 2°C. Las proteínas inactivas se precipitaron a pH 5.6 con ácido acético 2 M y el sobrenadante, constituido por las proteínas activas, fué precipitado con sulfato amónico hasta el 60 % de saturación. La enzima del precipitado se purificó posteriormente por filtración a través de una columna de Sphadex G-200 eluyendo con tampón fosfato 0.08 M pH 7.0.

El efecto inhibitorio de los cuatro prenil pirofosfatos mencionados fué estudiado espectrofotométricamente demostrándose que el fitilpirofosfato era el inhibidor más potente de la enzima de Hevea y Phaseolus mientras que el farnesil pirofosfato lo era sobre los dos Saccharomyces y

Cucumis. Las inhibiciones mayores se lograron con una concentración de inhibidor de 0.25 M. Las cinéticas de las inhibiciones, tanto en presencia de MVA como de ATP como sustratos variables pusieron de manifiesto que la inhibición es incompetitiva respecto al MVA y competitiva respecto al Mg-ATP^{2--} , calculandose asimismo la K_m y K_i de los cuatro inhibidores estudiados.

Más recientemente Gray y Kekwick (145) han estudiado los pesos moleculares, coeficientes de difusión y de sedimentación de la mevalonato cinasa de Hevea brasiliensis, Cucumis melo, Phaseolus vulgaris, Saccharomyces cerevisiae hígado de pollo e hígado de conejo, mediante filtración por gel en Sphadex G-100, Sephadex G-200 y centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa encontrando que la enzima tiene similares pesos moleculares (94.800-103.500), coeficientes de difusión ($5.39-5.62 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$) y coeficientes de sedimentación (5.85-6.00 S) en las seis preparaciones estudiadas.

Thomas y Stobart (146) han puesto de manifiesto la fosforilación del MVA en cultivos de Kalanchoe crenata demostrando un incremento de la actividad mevalonato cinasa de cloroplastos cuando el cultivo es iluminado después de un periodo de oscuridad.

Hill y Rogers (147) han estudiado la mevalonato cinasa de hojas, cotiledones y cloroplastos de Phaseolus vulgaris. El pH óptimo de la enzima fué 7.5. aunque a pH 5.5 los extractos de hojas y cotiledones tenían una apreciable actividad mevalonato cinasa, no así los cloroplastos en los que a este último pH la actividad era muy pequeña. Esto puede ser de-

bido a que los tampones usados no contenían fosfato inorgánico, la presencia del cual reduce la actividad fosfatasa. La mevalonato cinasa de este origen era estable durante largos periodos de tiempo conservada a 4°C tanto a pH 5.5 como a pH 7.5. Sin embargo al primer pH la enzima decrece su actividad alrededor del quinto día lo cual coincide con un aumento de la actividad fosfatasa en el mismo periodo y al mismo pH.

El p-cloro mercuribenzoato inhibía casi completamente la actividad mevalonato cinasa de cotiledones de Phaleolus a una concentración 0.1 mM. La iodoacetamida era mucho menos efectiva y una concentración 10 mM inhibía un 20 % a pH 5.5 mientras que practicamente no afectaba a pH 7.5. En todos estos casos la adición de un exceso de β -mercapto-etanol disminuía fuertemente esta inhibición.

La actividad mevalonato cinasa de cotiledones era aumentada mucho más fuertemente por Mg^{2+} 5 mM que por Mn^{2+} a la misma concentración. Asimismo fué estudiada la inhibición de la mevalonato cinasa por distintos intermedios terpenoides como el farnesil, geranil y por esteroides como el escualeno, lanosterol y sitosterol.

En hojas de Nepeta cataria Downing y Mitchell (148) han encontrado que el pH óptimo de la mevalonato cinasa es 7.0 estudiando también el tiempo óptimo de la reacción que es 90 min. Asimismo Downing y Mitchell (149) han estudiado la mevalonato cinasa de hojas y "callus" de Nepeta cataria encontrando en aquellos una mayor actividad mevalonato cinasa al contrario que en el "callus". La adición de iodoacetamida 5 mM aumenta la actividad mevalonato cinasa al impedir la formación de los prenil pirofosfato que inhibirían a la enzima.

En hígado de pollo Garcia - Martínez (93) estudia la fosforilación del ácido mevalónico en los primeros días del desarrollo y observa una clara diferencia en la curva de actividad pH entre la formación de fosfomevalónico y pirofosfomevalónico. La cantidad de fosfomevalónico formado es muy similar a pH 7.5 y 9.5 sin embargo el pirofosfomevalónico muestra un máximo a pH 9.5. La fosforilación del ácido mevalónico durante el desarrollo en los primeros días de vida del pollo no muestra una diferencia significativa entre el primer y sexto día después de la eclosión pero sí observan un incremento significativo en la cantidad de fosfomevalonato formado después del séptimo día después de la eclosión.

En 1977 se estudia por primera vez en algas Clorofíceas la incorporación de ácido mevalónico a derivados fosforilados (150) Utilizando como preparaciones enzimáticas extractos libres de células de suspensiones de Chlorella fusca. Se observó que el máximo de fosforilación total del ácido mevalónico se lleva a cabo a un pH de 8.2. Se estudió la fosforilación del ácido mevalónico en un tiempo de incubación entre cero y 120 minutos, observando que decrece la cantidad de pirofosfomevalónico formado cuando el tiempo de incubación pasa de 30 minutos. La actividad de las enzimas fosforilantes es inhibida por altas concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} . En todas las condiciones ensayadas se observa más cantidad de pirofosfomevalónico que de fosfomevalónico.

Ramachandran (6) ha estudiado las propiedades de la mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa en el sobrenadante de 105.00 x g de cerebro de rata y los cambios de actividad a lo largo del desarrollo. Los tres enzimas necesitan para su

actividad óptima la suplementación de ATP. La presencia de Mg^{2+} como catión divalente también es necesaria para la actividad óptima de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa el Mg^{2+} y el Mn^{2+} son igualmente efectivos para la pirofosfomevalonato descarboxilasa. El rango de pH óptimo para ambas enzimas es de 6.5–8.0 mientras que para la fosfomevalonato descarboxilasa es aproximadamente 6. No hay cambios de actividad dependientes de la edad para la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa mientras que la pirofosfomevalonato descarboxilasa incrementa su actividad durante la primera semana después del nacimiento y baja después del octavo día. La K_m de la mevalonato cinasa de cerebro es 312, 400 y 434 mM a los 2, 13 y 52 días de edad respectivamente.

1. 5. 2. – Fosfomevalonato cinasa

La formación de PP-MVA a partir de P-MVA en presencia de la enzima fosfomevalonato cinasa fué puesta de manifiesto por Henning y col. (151) en autolisados de levadura a partir de donde purificaron parcialmente la enzima y estudiaron algunas de sus características. La principal diferencia respecto a la mevalonato cinasa estriba en que la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa puede hacerse reversible por adición de un exceso de ADP. Los iones Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} activan a la enzima purificada unas 50 veces, la cual, a su vez presenta un amplio margen de actividad máxima entre los pH 5.5–10.0 (152).

En hígado de cerdo Helling y Popjak (153) han purificado la fosfomevalonato cinasa poniendo de manifiesto asimismo la reversibilidad de la reacción por ella catalizada. La enzima tiene un pH óptimo de 7.3 en presencia de Mg^{2+} .

Slakey y col (21) han estudiado la fosfomevalonato cinasa de hígado de rata. En estas experiencias los animales eran sometidos a ayuno seguido de una realimentación. En estas condiciones la actividad fosfomevalonato cinasa no se alteró significativamente no mostrando tampoco ritmo diurno.

En homogenados de aorta de cerdo Slakey y col. (11) después de precipitar el sobrenadante de la centrifugación a 105.000g con sulfato amónico entre el 15-60% de saturación observaron la formación de PP-MVA a partir de MVA. La presencia de fosfatasas activas hizo que la cantidad de PP-MVA formado en ausencia de FK fuese ligeramente menor que la observada en presencia de FK, inhibidor de las fosfatasas.

Recientemente Ramachandra y Sah (6) han estudiado la formación de Ip-PP a partir de MVA en hígado de ratas lactantes y destetadas, la cantidad de PP-MVA formado en ratas destetadas aumenta casi un 100% respecto al formado por ratas lactantes obteniéndose valores similares en ratas alimentadas con una dieta suplementada con 1 % de colesterol que en ratas alimentadas con una dieta normal.

Esta diferencia de la actividad de fosfomevalonato cinasa en ratas lactantes y destetadas pudiera sugerir según los autores que esta enzima es limitante en la formación de $ip-PP$ aunque el hecho de que la enzima sea reversible (153) hace pensar que las reducidas cantidades de $PP-MVA$ formadas en ratas lactantes no refleja necesariamente la baja actividad de la fosfomevalonato cinasa.

Aunque durante la biosíntesis del $Ip-PP$ por el latex de Hevea brasiliensis se acumula muy poca cantidad de $PP-MVA$ Skilleter y col (154) han puesto de manifiesto en el suero del latex reconstituido la presencia de la fosfomevalonato cinasa en presencia de ATP. El suero reconstituido fué dializado frente a tampón fosfato 50 mM pH 7.0 conteniendo Mg^{2+} 5 mM y N-acetil cisteína 4 mM y posteriormente aplicado a una columna de Sephadex G-200 y eluido con el mismo tampón. La fracción protéica activa fué concentrada por diálisis a presión y aplicada a una nueva columna de DEAE-Sephadex. Se obtuvo así fosfomevalonato cinasa libre de pirofosfomevalonato descarboxilasa que la impurificaba. La enzima era muy inestable y su pH óptimo estaba comprendido entre 7.0 y 7.5. Asimismo perdía su actividad cuando se eliminaban los iones Mg^{2+} ó Mn^{2+} y los compuestos protectores de grupos tiólicos. La actividad óptima se logra en presencia de Mg^{2+} 8 mM actividad que es unas 2.5 veces mayor que la alcanzada en presencia de la concentración óptima de Mn^{2+} (3mM). Los valores de las K_m fueron 0.04mM para el $P-MVA$ y 0.14 mM para el ATP incrementándose ambas al aumentar la temperatura hasta los 40°C.

La estequiometría de la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa de latex de Hevea brasiliensis ha sido estudiada por Skilleter y Kekwick (155) los cuales han demostrado que el PP-MVA y el ADP se forman en cantidades equimoleculares. Varios iones metálicos divalentes pueden activar a la enzima si bien la relación metal / ATP es diferente en cada caso : 3 para el Mg^{2+} , 1 para el Mn^{2+} , 2 para el Zn^{2+} y 4 para el Fe^{2+} . En cuanto a la especificidad frente a los nucleótidos la enzima es inactiva con el CTP y el GTP y solo alcanza un 13% de la actividad lograda con ATP 5 mM en presencia de ITP de la misma concentración y un 6% frente a UTP también 5 mM.

En Pinus radiata Valenzuela y col (132) han puesto de manifiesto la formación de PP-MVA a partir de MVA observando que la concentración de PP-MVA formado era muy pequeña lo que podía ser debido a la baja actividad de la fosfomevalonato cinasa en comparación con la pirofosfomevalonato descarboxilasa.

Potty y Bruemmer (142) han estudiado la fosfomevalonato cinasa en vesículas de zumo de los frutos de la naranja encontrando que el pH óptimo era de 6.5 y que la concentración óptima de ATP era de 7.5 mM. concentraciones superiores de ATP inhibían la formación de PP-MVA. Asimismo la enzima requería para su máxima actividad la adición de protectores de grupos -SH como β -mercaptoetanol y glutatión. La adición de iodoacetamida inhibía la actividad enzimática.

En cultivos de Kalanchoë crenata Thomas y Stobart (146) han estudiado la fosforilación del MVA observando la formación de PP-MVA en cantidades bastantes superiores a las de P-MVA. Asimismo la exposición a la luz de cultivos crecidos en la oscuridad originaba un aumento de la cantidad de PP-MVA formado.

La fosfomevalonato cinasa de Phaseolus vulgaris ha sido estudiada conjuntamente con la mevalonato cinasa por Hill y Rogers (147) La formación de PP-MVA era mayor a pH 7.5 que a pH 5.5 tanto en hojas como en cotiledones.

Green y Baisted (129) estudiando la fosfomevalonato cinasa de Pinus sativum observaron que el pH óptimo era 7.3 y que las 12 horas de germinación de las semillas la actividad de la enzima era máxima siendo el incremento un 400 % respecto a las 2 horas de germinación.

La fosfomevalonato cinasa de este origen resultó ser la segunda enzima más activa del proceso por el cual el MVA se convierte en escualeno.

En hojas y "cullus" de Nepeta cataria Downing y Mitchell (148, 149) han puesto de manifiesto la actividad fosfomevalonato cinasa observando que es necesario un mayor tiempo de incubación para obtener el máximo nivel de PP-MVA que el de P-MVA. En "callus" la actividad fosfomevalonato cinasa es menor que en hojas. La adición de iodoacetamida aumenta la cantidad de PP-MVA formado.

En Pinus pinaster García-Peregrín (136) observó que la formación de PP-MVA aumentaba con la adición al medio de incubación de glutatión ó cisteína 10^{-2} M mientras que la adición de ácido ascórbico 10^{-2} M inhibía aproximadamente un 40 % la formación de PP-MVA.

También estudió la influencia de diversos inhibidores de grupos -SH como iodoacetamida, p-hidroximercuribenzoato y N-etilmaleimida. Estos dos últimos inhibían completamente la formación de PP-MVA a una concentración 10^{-2} M mientras que la iodoacetamida a la misma concentración inhibía solo un 70%. La suplementación de glutatión disminuía la inhibición producida por iodoacetamida pero no así con la producida por p-hidroximercuribenzoato.

Asimismo en Agave americana García Peregrin (139) ha estudiado la incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA en extractos libres de células y extractos preparados a partir de polvos acetónicos obteniéndose cantidades similares de ambos lo que indica actividad fosfomevalonato cinasa. El pH óptimo fué 7.9

El β -mercaptoetanol añadido al tampón usado en la preparación de extractos aumenta considerablemente la cantidad de PP-MVA formado. El FNa añadido al medio de incubación protege al PP-MVA formado debido probablemente a la inhibición de la actividad fosfatasa presente en el medio.

II.- PLAN DE TRABAJO



II. - PLAN DE TRABAJO

A la vista de los antecedentes bibliográficos expuestos y de los trabajos anteriormente desarrollados en nuestro Departamento se planteó el siguiente plan general de trabajo:

1. - Establecimiento de las condiciones óptimas para el estudio "in vitro" de la del MVA por extractos de cerebro y riñón de pollo recién nacido.
2. - Establecimiento del papel del cerebro y del riñón en las primeras etapas del metabolismo del MVA durante el desarrollo postnatal del pollo.
3. - Estudio de las características de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa en preparaciones libres de células de ambos órganos.
4. - Comprobación de las posibles variaciones que ambas actividades enzimáticas presentan a lo largo de los primeros días del desarrollo postnatal del pollo.
5. - Estudio del efecto de algunos factores fisiológicos como suplementación de colesterol en la dieta, ayuno, ritmo cíclico luz-oscuridad, sobre la fosforilación del MVA en cerebro y riñón

III. - PARTE EXPERIMENTAL

III. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. - MATERIAL Y METODOS

3.1.1. - Material biológico

Se han utilizado pollos machos de raza Leghorn Blanca, cuyas edades oscilaron entre cero y diez días.

Los pollos se alimentaron con una dieta estandar,

3.1.2. - Preparaciones enzimáticas

El riñón ó cerebro eran extraídos del pollo muerto por decapitación y se ponían en solución salina al 0.9% a 4°C.

Cada uno de los órganos se homogenizaron con tampón Tris-malato 0.05 M. pH 7.5. La trituración se llevó a cabo en un homogenizador Potter mecanico (MSE) de pistilo de vidrio sin esmerilar a 4°C en proporción órgano/tampón 1:10 (p/v).

El homogenizado se centrifugó a 15.000 x g y 4°C en una centrifuga refrigerada Beckman modelo J 21 B durante 30 min. Una vez centrifugado, el sobrenadante fué usado como extracto libre de células.

3.1.3. – Preparación de tampones

El tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 se preparó mezclando soluciones de Tris-maleato 0.2 M (12.114 g de Tris Merck y 11 g de ácido maléico Merck en 1.000 ml) y NaOH 0.2 M (8g de NaOH Carlo Erba en 1.000 ml) en la proporción siguiente:

Tris-malato 0.2 M..... 50 ml
NaOH 0.2 M..... 50 ml

Esta mezcla se llevó hasta un volumen cercano a 200 ml con agua destilada y se terminó de ajustar con NaOH 0.2 M al pH indicado en pHmetro Beckman Spandomatic. Finalmente se completó con agua destilada a un volumen de 200 ml.

3.1.4. – Determinación del contenido protéico

La cantidad de proteínas de los extratos enzimáticos se determinó por el método de Lowry y col (69) basado en la asociación de las reacciones de biuret y de Folin, la primera característica de los enlaces peptídicos y la segunda del grupo fenólico de los restos de tirosina.

3.1.4.1. – Curva patron de la albúmina

Se ha usado curva patron de albumina bovina a concentraciones entre 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se prepara una solución estandar en agua destilada de albúmina bovina con un contenido de 500 $\mu\text{g/ml}$. A partir de ésta se prepara la curva patrón de la siguiente forma:

<u>Tubos</u>	<u>ml sol. estandar</u>	<u>ml agua</u>	<u>$\mu\text{g/ml}$ proteína</u>
0	0	1.0	0
1	0.1	0.9	50
2	0.2	0.8	100
3	0.3	0.7	150
4	0.4	0.6	200
5	0.5	0.5	250

3. 1. 4. 2. – Metódica

Una vez preparada la curva patrón se preparan otros tubos de ensayo con 1 ml de las soluciones a medir haciendo varias diluciones de cada una de ellas para que la concentración protéica quede dentro del margen marcado por la curva patrón.

Se agregan a tiempo cero, 5 ml de la solución alcalina de cobre agitando bien en un agitador mecánico de tipo Whirlimixer. Al cabo de 15 minutos se añaden 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu mezclando perfectamente, 20 minutos después de esta última adición se hace la lectura a 630 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20, Bausch-Lomb ajustandolo el cero y el 100 de la escala con el blanco indicado.

3.1.4.3. - Cálculos

Con los resultados suministrados por las distintas concentraciones de la solución estandar se construye una curva patrón representando en ordenadas las densidades ópticas y en abcisas las concentraciones protéicas correspondientes expresadas en $\mu\text{g/ml}$. Sobre ella se llevan los valores de D.O. de los problemas, deduciéndose por interpolación, y una vez tenidas en cuenta las diluciones previas, la concentración protéica final (fig. 1 y 2).

3.1.4.4. - Reactivos

a) Albúmina bovina (Fracción V, Powder), suministrada por Armour Pharmaceutical Co. Chicago, Illinois, USA.

b) Solución alcalina de cobre. Mezclar 50 ml de solución al 2 % carbonato sódico (Merck) en NaOH (Carlo Erba) 0.1 M con 1 ml de solución al 0.5 % de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) en tartrato sódico al 1%. Se prepara extemporaneamente.

c) Reactivo diluido de Folin-Ciocalteu (Analema) que en el momento de hacer la determinación se diluyó al doble con agua destilada.

Figura nº 1

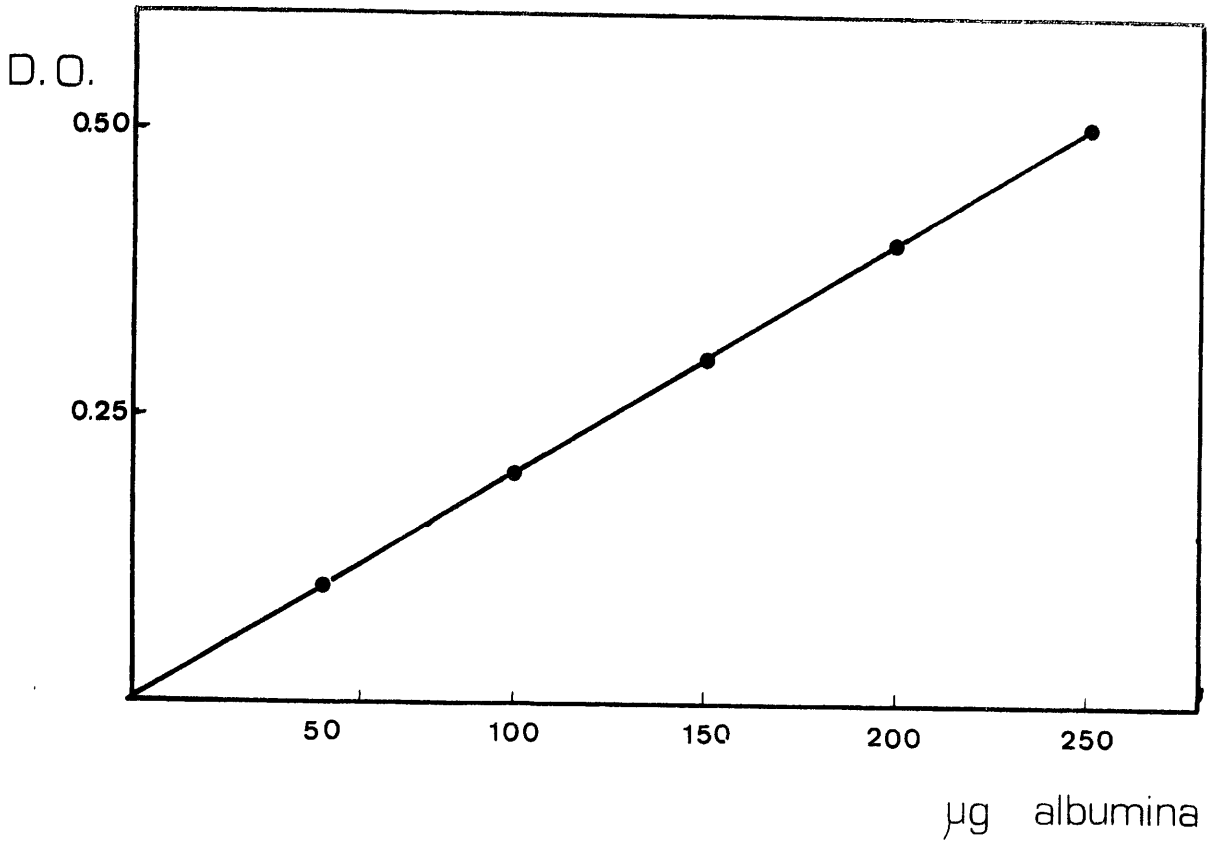
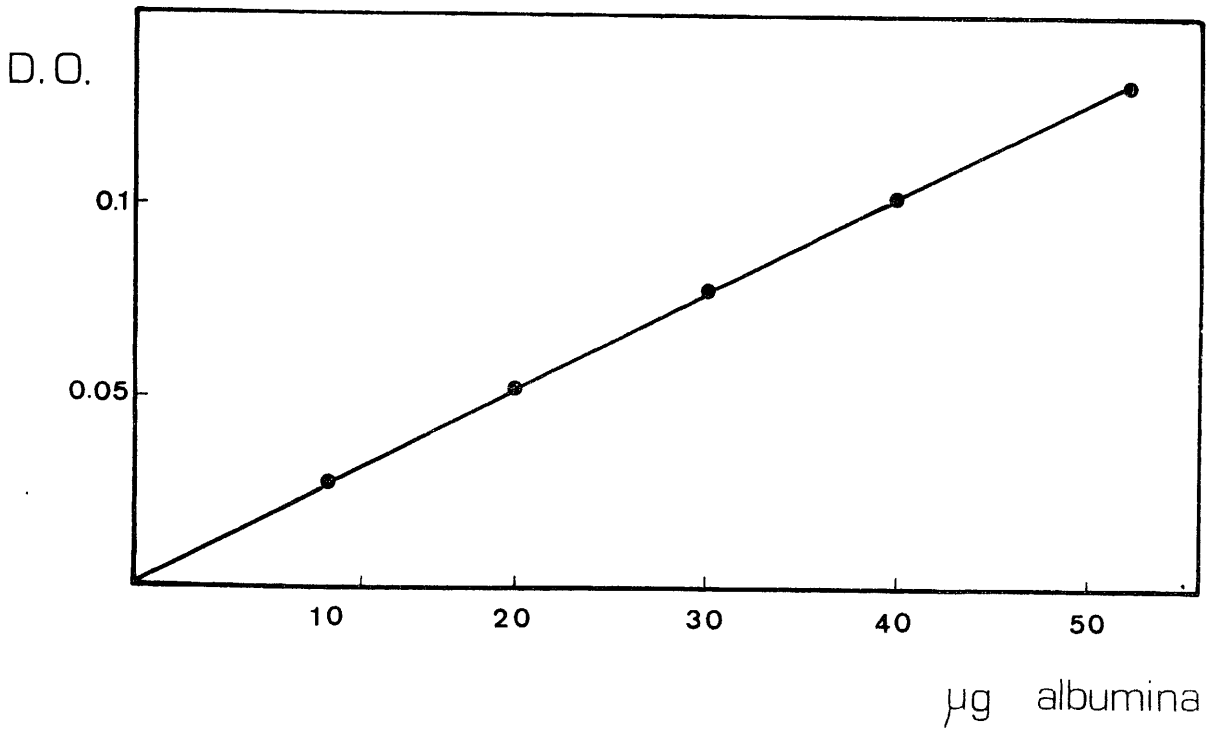


Figura nº 2



3. 1. 5. - Determinación de la actividad enzimática

3. 1. 5. 1. - Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C. durante tiempo variable en presencia de 2-¹⁴C-MVA, ATP y otros cofactores a concentraciones especificadas en cada caso.

Los extractos enzimáticos eran diluidos previamente hasta una concentración de proteínas que permitiera trabajar en la zona exponencial de la curva proteínas/actividad.

Las reacciones se detienen desnaturalizando las enzimas por calentamiento a 90°C durante 5 min. El precipitado se separa por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 min. a temperatura ambiente en centrifuga Piccolo (Martin Christ).

3. 1. 5. 2. - Reactivos utilizados

La solución de ácido mevalónico se ha preparado a partir de su lactona suministrada por "The Radiochemical Centre" Amersham Inglaterra.

Para pasar el ácido al estado de sal potásica se comienza por calentar a 50°C la solución bencénica hasta evaporación total del disolvente. Una vez seco se trata con una solución de KOH que contenga -en un volumen adecuado a la actividad final deseada- KOH en exceso respecto al número de equivalentes ácidos existentes. El pH de la disolución será aproximadamente 10. Dicha solución se mantiene a 37°C durante 30 min.

al cabo de los cuales se habrá roto el anillo lactónico originando la sal potásica que se conserva a -20°C hasta su utilización, antes de la cual es necesario mantenerla de nuevo a 37°C durante 30 min.

El MVA así preparado debe tener una actividad de $10\ \mu\text{ci}/\text{ml}$ y una concentración de $1.7\ \mu\text{mol}/\text{ml}$ concentración que se obtiene adicionando en caso de ser necesario la cantidad de MVA no radiactivo correspondiente. Para la reacción se han tomado $0.050\ \text{ml}$ quedando con una concentración de $33.3\ \mu\text{M}$ y $0.5\ \mu\text{ci}$ en un volumen final de $1.5\ \text{ml}$.

Siempre que no se especifique otra cosa la solución de ATP sal disódica (Sigma) se ha preparado extemporaneamente en Tampón Tris-maleato $0.05\ \text{M}$, $\text{pH}\ 7.5$ $49.14\ \text{mg}/\text{ml}$ de forma que tomando $0.150\ \text{ml}$ queda en el tubo la reacción, con volumen final de $1.5\ \text{ml}$, a una concentración $8\ \text{mM}$. El cloruro de Magnesio $6\ \text{H}_2\text{O}$ (Merck) se preparó en Tampón Tris-maleato $0.05\ \text{M}$ $\text{pH}\ 7.5$ ($24.39\ \text{mg}/\text{ml}$) de forma que tomando $0.050\ \text{ml}$ queda con una concentración final de $4\ \text{mM}$.

3.1.6. - Detección y medida de los productos de la reacción

3.1.6.1. - Radiocromatografía en papel

Los productos originados en las reacciones enzimáticas a partir de $\text{MVA}-2-^{14}\text{C}$ se han analizado mediante cromatografía en papel del sobrenadante obtenido después de la centrifugación anteriormente mencionada.

Se ha utilizado papel Whatman nº 1 preparando tiras de 35 mm de ancho y 85 mm de largo. A 3 cm. del origen se coloca la muestra, generalmente una alícuota de 25 μ l con micropipetas "emil Works" de enrase automático por estrangulamiento (Auto Cero High Precision) utilizando para el secado una corriente de aire caliente.

Se han utilizado campanas de cromatografía de vidrio hermeticamente cerradas y saturadas previamente con el líquido de desarrollo.

El líquido empleado ha sido butanol: ácido fórmico: agua (77:10:13), suministrados tanto el butanol como el ácido fórmico por Carlo Erba, el desarrollo es ascendente durante un tiempo de 12 h.

Una vez finalizado el desarrollo los cromatogramas se secan a temperatura ambiente, observándose el frente alcanzado por el disolvente bajo una lámpara monocromática de 260 nm "Havevia". Por el mismo procedimiento se pueden localizar los nucleótidos de la adenina que presentan un máximo de absorción a esta longitud de onda.

En este líquido de desarrollo los Rf observados para los productos de la reacción así como para el MVA que ha quedado sin reaccionar son los siguientes:

<u>Producto</u>	<u>Rf</u>
PP-MVA	0.01-0.05
P-MVA	0.10-0.15
MVA	0.75

3.1.6.2. - Detección y medida de radiactividad

Posteriormente se cortan las bandas de 35 mm de anchas -previamente señaladas a lápiz- y se unen unas a continuación de otras para medir su radiactividad en el sistema Actigraph III, mod. 1002 (Nuclear Chicago), constituido por dos detectores tipo Geiger de flujo gaseoso situados muy próximos entre los cuales para el cromatograma. Los impulsos producidos pasan a un registrador obteniéndose una gráfica en la que cada pico corresponde a una sustancia marcada. Como gas portador se ha utilizado el gas Q (helio-butano).

Se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo: escala, 5.000; velocidad, 30; anchura de colimador 12 y constante de tiempo 10.

3.1.6.3. - Expresión de la actividad específica

Los picos de radiactividad obtenidos al pasar el cromatograma por los contadores Geiger vienen expresados directamente en c.p.m. Para pasar a d.p.m. construimos una curva patron en la cual ponemos cantidades conocidas de MVA-2-¹⁴C que al pasar por el "Actigraph" nos darán las c.p.m. correspondientes a cada valor de d.p.m. (fig. 3 y tabla 1) este proceso se repetiría en caso de medir en las distintas escalas del aparato.

Los valores de c.p.m. obtenidos en las reacciones enzimáticas se interpolan en la curva, obteniéndose las d.p.m. de la alícuota puesta en el papel de cromatografía, la cual se transforma en d.p.m. totales multiplicando por el factor de corrección adecuado. Estas d.p.m. totales se dividen por la cantidad específica expresada en d.p.m./mg de proteína.

TABLA I

<u>μCi</u>	<u>d.p.m.</u>	<u>c.p.m.</u>
1×10^{-4}	222	60
2×10^{-4}	444	90
3×10^{-4}	666	145
4×10^{-4}	888	175
5×10^{-4}	1.110	225
6×10^{-4}	1.330	250
8×10^{-4}	1.776	350
1×10^{-3}	2.220	400
1.2×10^{-3}	2.664	500

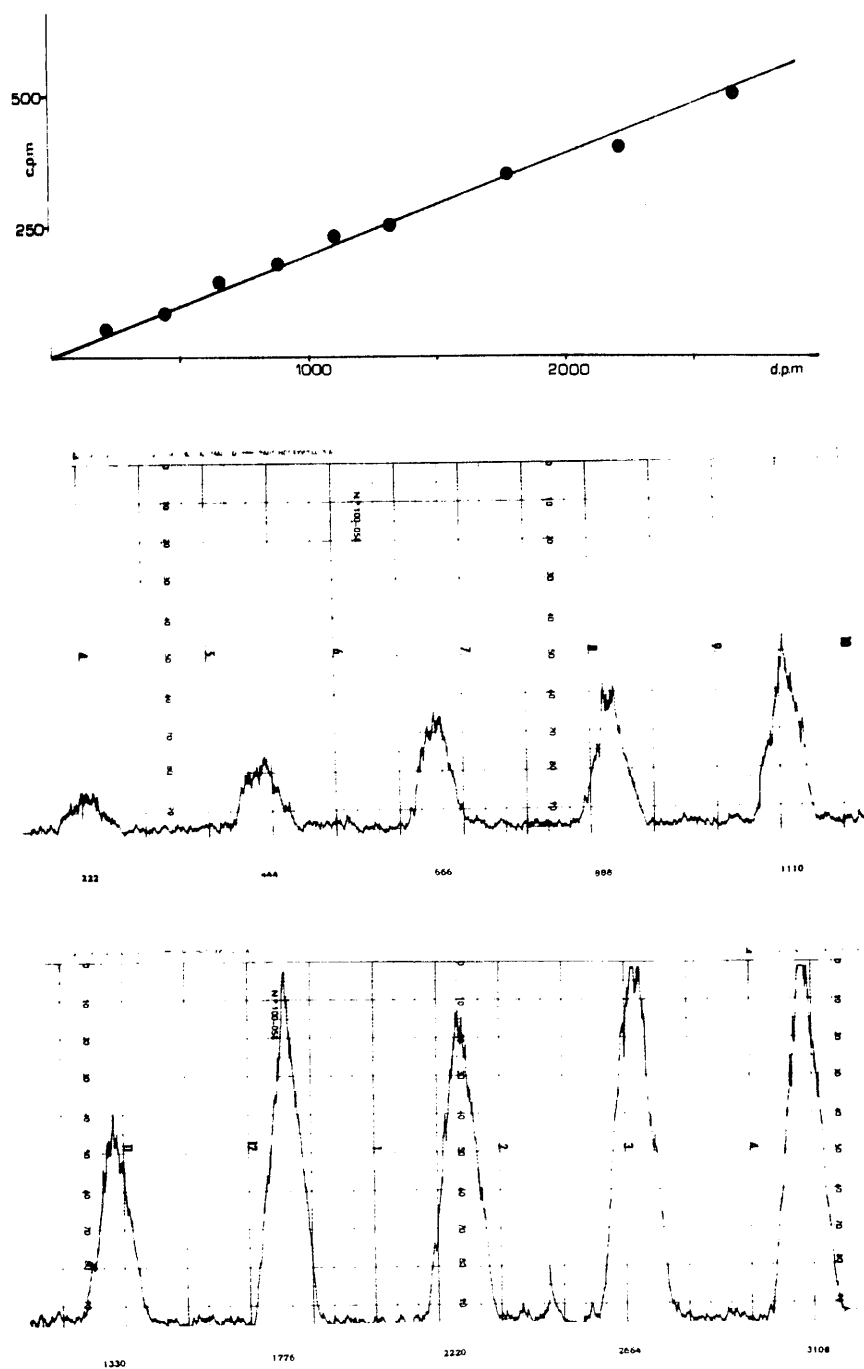


Fig. 3.- Proporcionalidad entre la actividad de las muestras (en d.p.m.) y la altura de los picos registrados en la gráfica (en c.p.m.). Condiciones de medida: Col. = 12; CT. = 10; Esc. = 500; Vel. = 30.

3.2. - RESULTADOS

3.2.1. - FOSFORILACION DEL ACIDO MEVALONICO EN CEREBRO DE POLLO RECIEN NACIDO

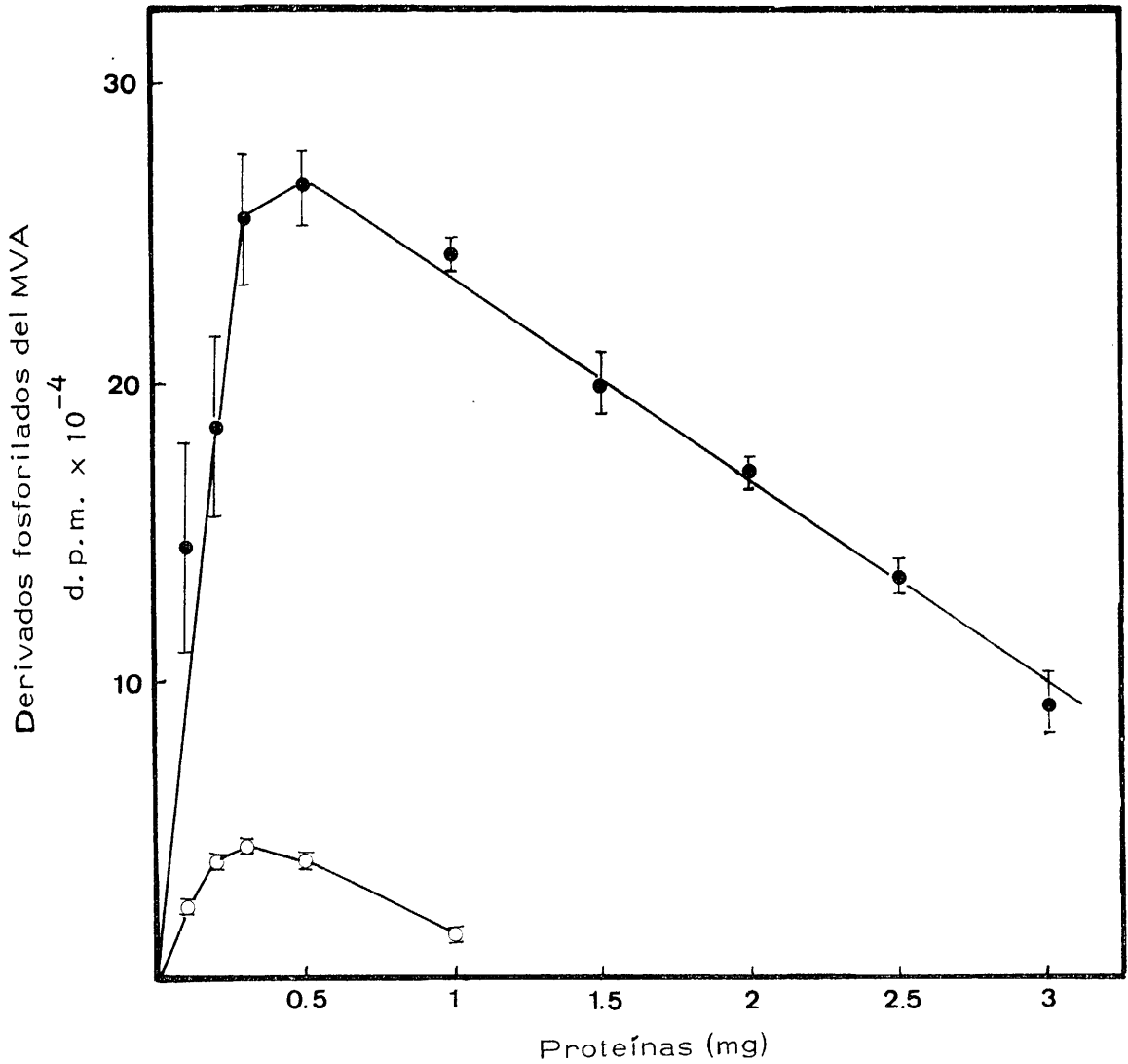
3.2.1.1. - Influencia de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

Con objeto de hallar la zona exponencial de la curva proteínas/actividad fosforilante que nos permitiera trabajar con una concentración de proteínas en los extractos que fuera proporcional a la cantidad de productos obtenidos, se hicieron reacciones enzimáticas con un margen de 0 a 3 mg de proteínas. Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C durante 30 minutos en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM), $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. La representación gráfica de los resultados hallados de dichas reacciones muestran que la cantidad de P-MVA formado es proporcional hasta 0.3 mg de proteína mientras que el PP-MVA formado se incrementa linealmente hasta 0.2 mg de proteínas (Fig nº 4)

3.2.1.2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones

Con objeto de determinar el tiempo óptimo de la reacción enzimática se hicieron experiencias incubando los extractos a 37°C durante diferentes tiempos, en un intervalo de 0-120 minutos. Las reacciones se hicieron en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM) ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci)

Figura nº 4



Influencia de la concentración de proteínas de extractos libres de células de cerebro de pollo, sobre la formación de derivados del MVA. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○). PP-MVA observado.

en un volumen final de 1.5 ml.

Se observó que tanto la formación de P-MVA como de PP-MVA aumenta linealmente hasta los 30 minutos, momento a partir del cual se mantiene en los mismos niveles (Fig. nº 5).

3.2.1.3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA

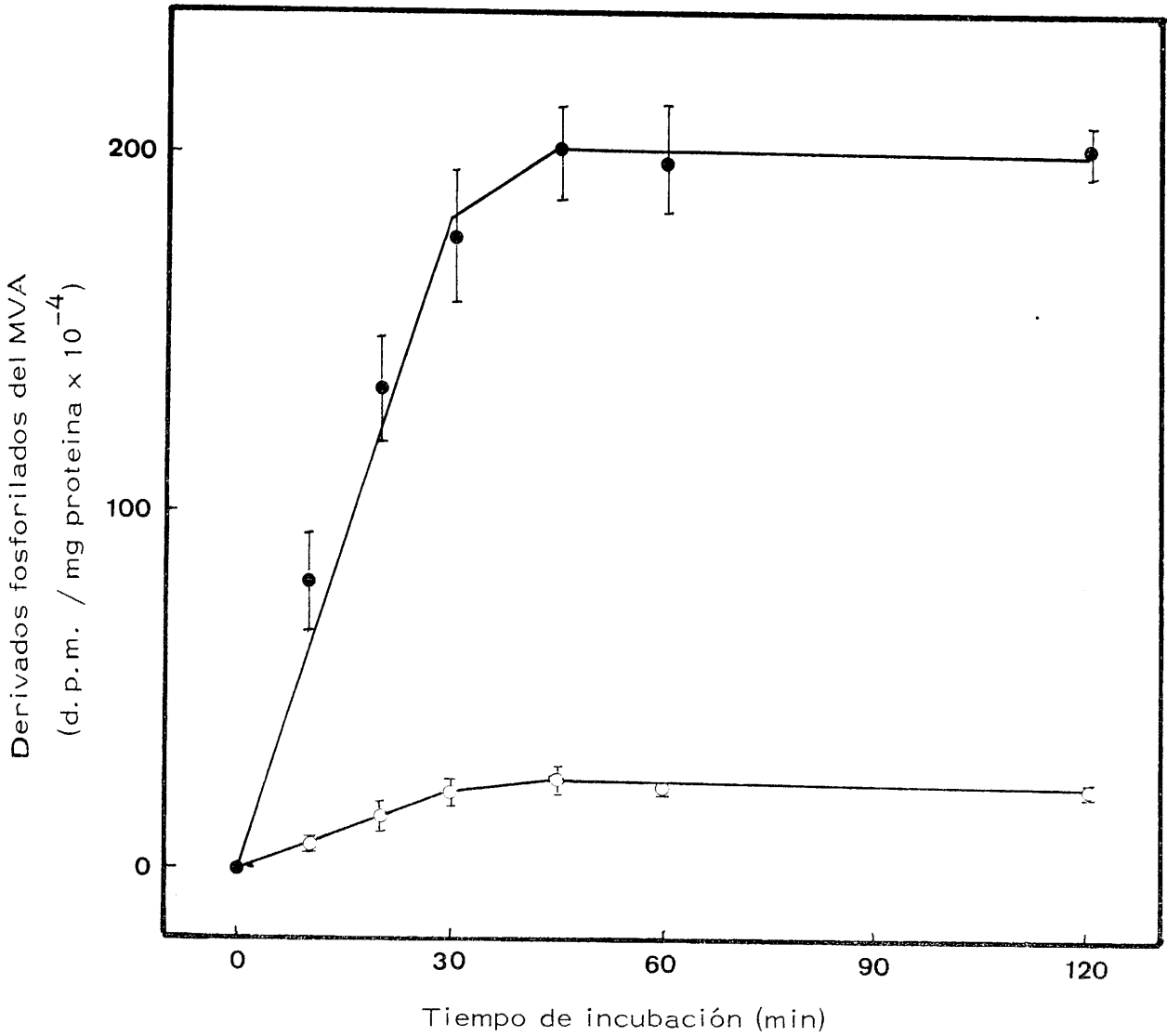
Se hicieron reacciones en medio de tampón Tris-maleato 0.05 M y pH comprendido entre 5.5 y 9.5. y en presencia de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3. μM , 0.5 μCi) en un volumen final de 1.5 ml, incubando a 37°C durante 30 min.

Como puede apreciarse en la Fig nº 6 tanto la cantidad de P-MVA como de PP-MVA aumenta al aumentar el pH dentro del margen ensayado, alcanzando las cantidades mayores de ambos derivados fosforilados a pH 9.5

3.2.1.4. - Distribución intracelular de los enzimas fosforilantes del MVA

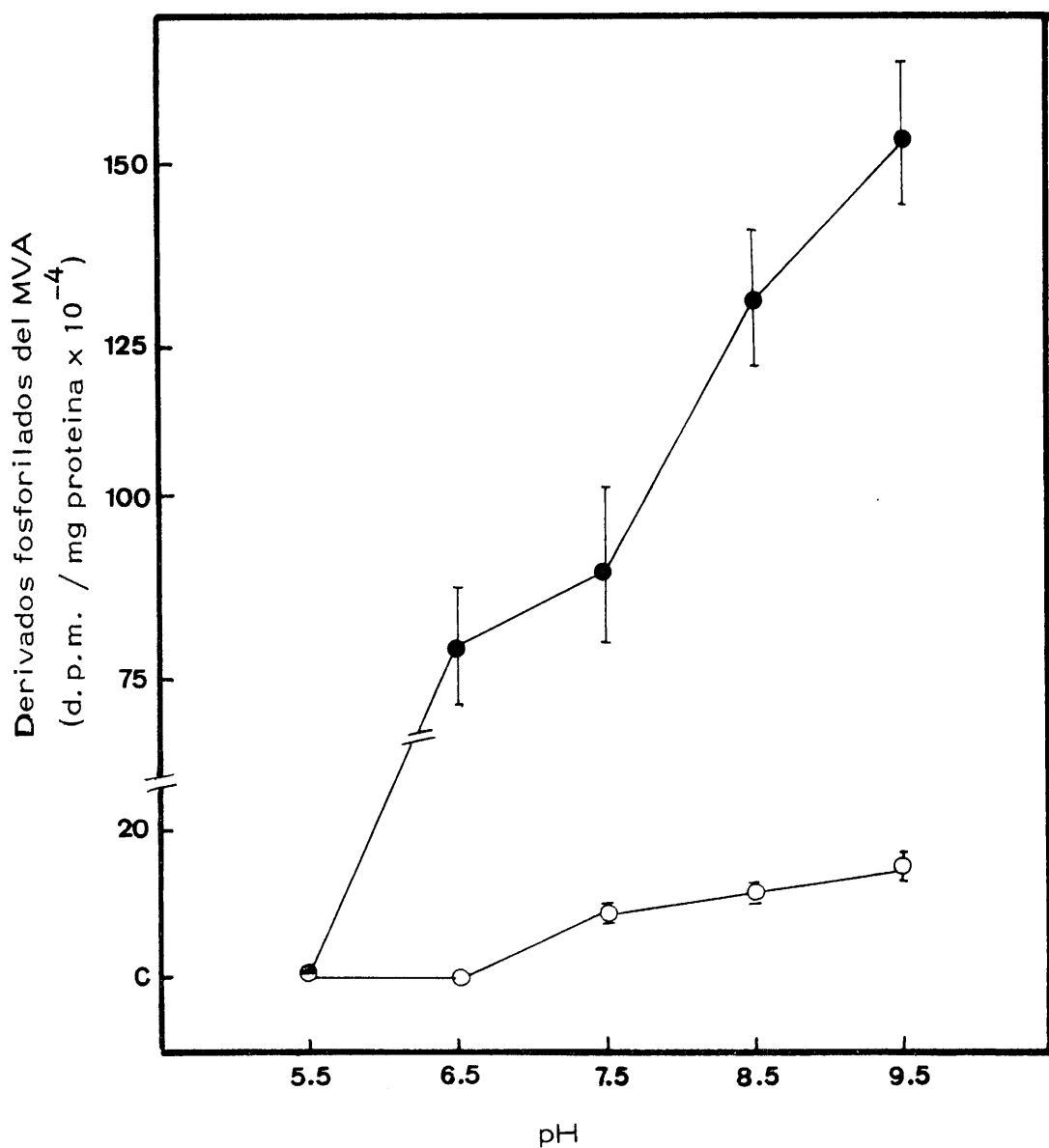
Con objeto de estudiar la localización de las enzimas fosforilantes del MVA se midieron actividades mevalonato cinasa y fosfo-mevalonato cinasa en las distintas fracciones subcelulares.

Figura nº 5



Influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. (●) P-MVA observado, (○) PP-MVA observado.

Figura nº 6



Efecto del pH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○) PP-MVA observado

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl_2Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml.

Los resultados obtenidos (Tabla II) muestran que ambas actividades enzimáticas se localizan esencialmente en la fracción soluble (sobrenadante de 105.000 $\times g$).

3.2.1.5. - Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA

Las preparaciones enzimáticas se sometieron a temperaturas de 50°C y 65°C a diferentes tiempos entre 0 y 60 min. En estas condiciones no se observó ninguna formación de PP-MVA. La Fig. nº 7 muestra la inactivación total de la mevalonato cinasa al ser sometida 10 min a 65°C mientras que el tratamiento a 50°C origina un pequeño incremento de la actividad específica de la mevalonato cinasa a los 10 min de tratamiento, bajando un 75% de esta actividad a partir de los 15 min de preincubación.

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl_2Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml.

3.2.1.6. - Efecto de los nucleótidos

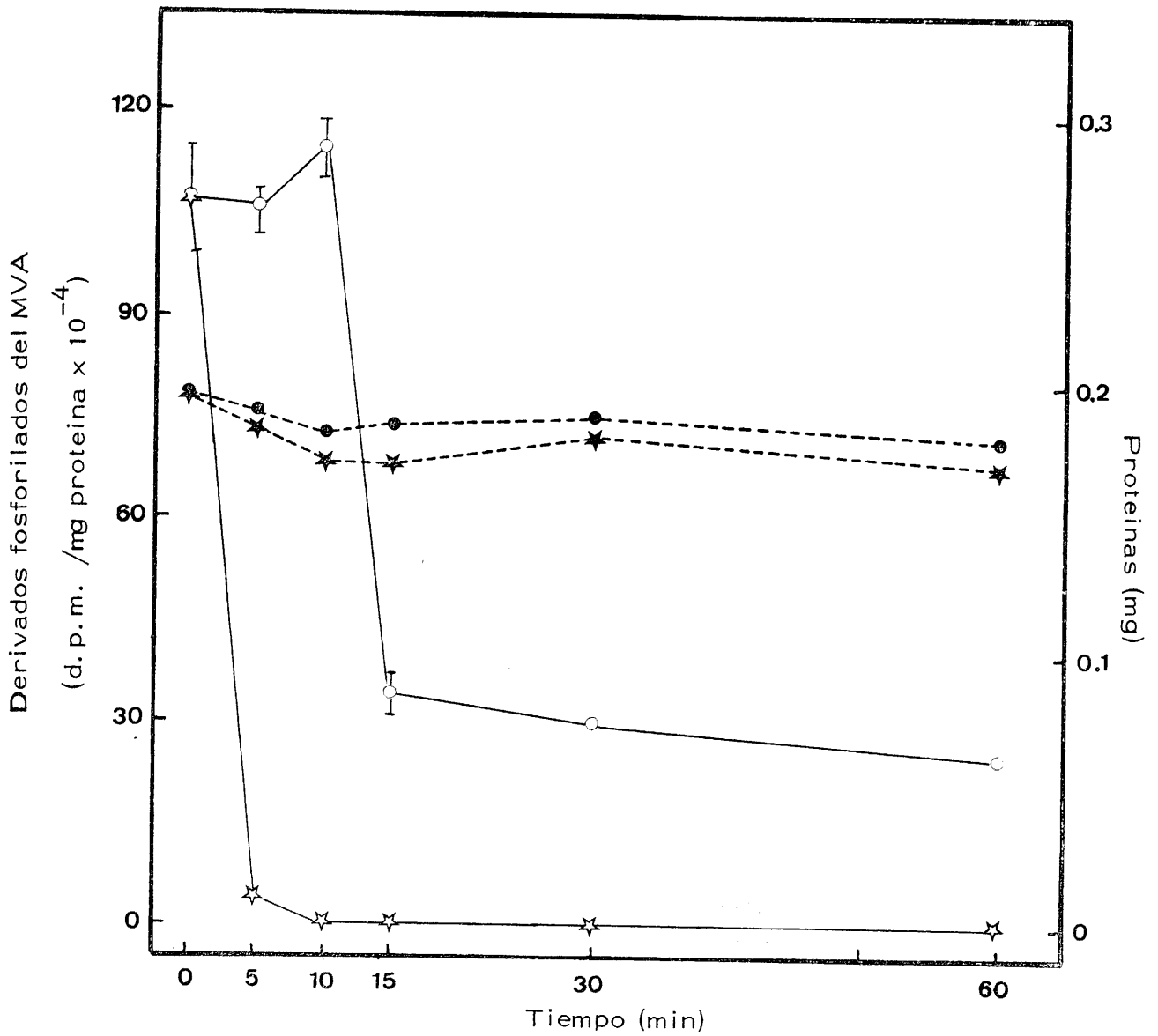
Para estudiar los requerimientos nucleotídicos de la formación de P-MVA y PP-MVA se hicieron reacciones enzimáticas en las

TABLA II

Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del MVA, por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

	Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
	P - MVA	PP - MVA
Extracto libre de células	48.7 \pm 3.7	3.2 \pm 0.1
Sobrenadante 15.000 xg	89.0 \pm 2.0	15.0 \pm 2.0
Precipitado 15.000 xg	17.5 \pm 2.3	0.0
Sobrenadante 105.000 xg	168.8 \pm 9.1	8.0 \pm 0.3
Precipitado 105.000 xg	22.7 \pm 3.9	0.0

Figura nº 7



Estabilidad térmica las enzimas fosforilantes del MVA. Efecto de la preincubación a distintas temperaturas de extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media. Los puntos unidos con líneas continuas representan la cantidad de P-MVA observado tras el mantenimiento de los extractos a 50°C (○) y a 65°C (☆). Los puntos unidos con líneas discontinuas representan la concentración protéica de los extractos tras la preincubación de los mismos a 50°C (●) y a 65°C (✱).

cuales se ensayaron los nucleótidos ATP, ITP, UTP, y GTP a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM en un medio de Tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) con volumen final 1.5 ml y $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3. μM y 0.5 μci).

Los resultados de la Tabla III muestran la necesidad total de nucleótidos para la fosforilación del MVA, siendo el ATP con el que se alcanza mayor cantidad de derivados fosforilados, tanto de P-MVA como de PP-MVA seguido en efectividad por el ITP. Con el UTP y el GTP la cantidad de P-MVA y PP-MVA formado es muy pequeña (Fig. nº 8). La formación de P-MVA en presencia de ATP y de ITP se incrementa a medida que lo hace la concentración de nucleótido adicionado, alcanzándose el máximo en presencia de nucleótido 10.0 mM. Sin embargo, la cantidad de PP-MVA observado es mayor en presencia de ATP ó ITP 5.0 mM, disminuyendo ligeramente cuando el nucleótido se suplementa a concentración 10.0 mM.

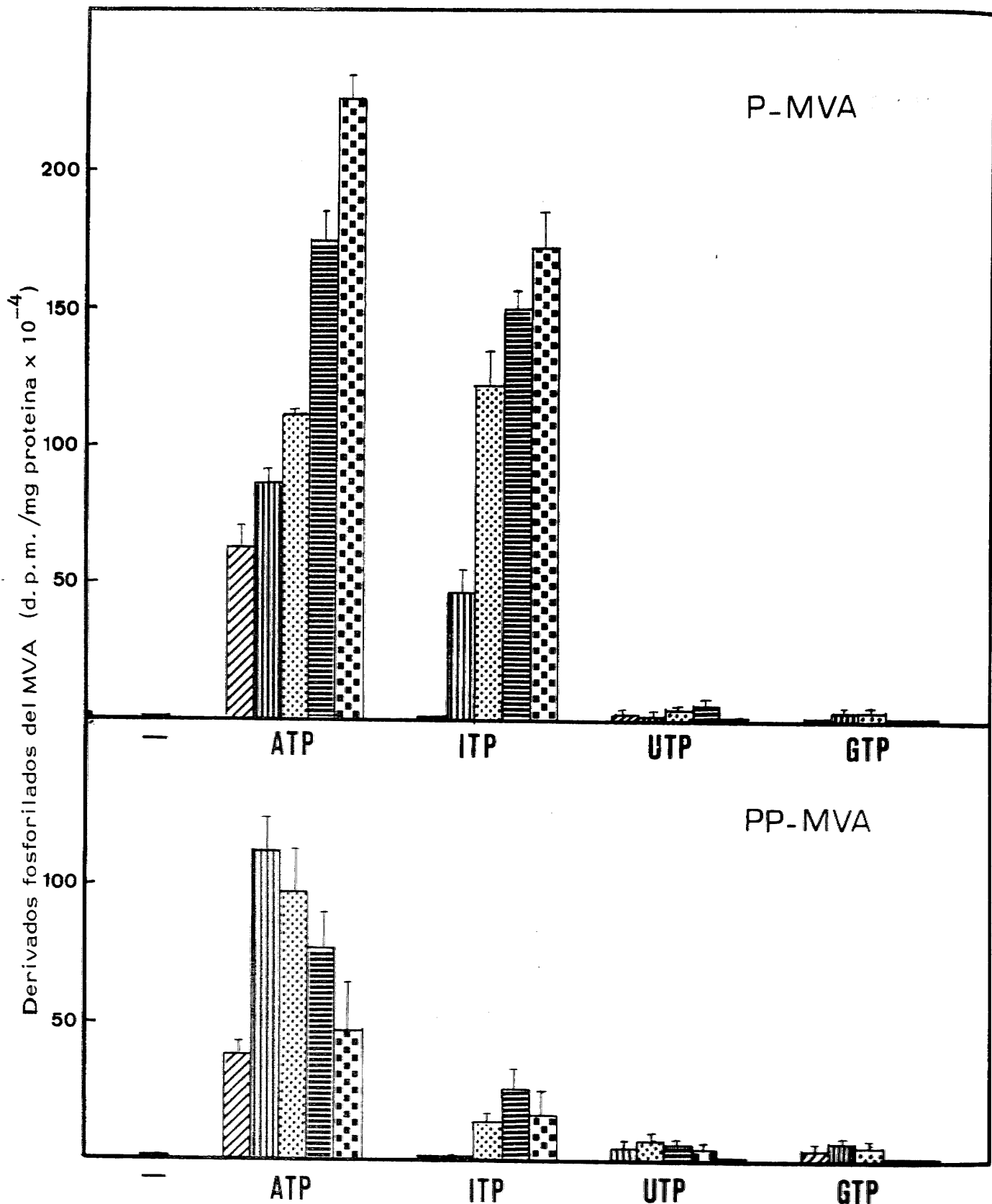
3.2.1.7. - Efecto de los cationes divalentes

Como todas las cinasas, la mevalonato cinasa y la fosfomevalonato cinasa requieren la presencia de cationes divalentes, para su actuación. Por tal motivo se ensayaron las reacciones de incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA por extractos libres de células en presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} , a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM. El volumen final de la reacción fué 1.5 ml en medio de tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM), ATP

TABLA III

Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP, y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos, excepto los nucleótidos cuya concentración final fué indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteína $\times 10^{-4}$)	
Nucleótido	Concentración (mM)	P-MVA	PP - MVA
—	—	0.0	0.0
ATP	0.1	63.1 \pm 6.8	39.3 \pm 4.8
	0.5	86.5 \pm 4.5	112.4 \pm 13.2
	1.0	111.2 \pm 0.0	96.5 \pm 13.6
	5.0	174.8 \pm 10.8	77.6 \pm 15.5
	10.0	226.5 \pm 7.1	47.1 \pm 17.4
ITP	0.1	0.0	0.0
	0.5	47.2 \pm 7.9	0.0
	1.0	122.2 \pm 12.9	13.8 \pm 1.5
	5.0	149.4 \pm 6.8	24.7 \pm 5.8
	10.0	173.2 \pm 13.1	18.9 \pm 8.2
UTP	0.1	3.0 \pm 0.2	4.6 \pm 1.7
	0.5	2.8 \pm 0.2	7.0 \pm 1.2
	1.0	5.9 \pm 1.6	5.9 \pm 0.2
	5.0	5.9 \pm 0.2	4.9 \pm 1.0
	10.0	0.0	0.0
GTP	0.1	0.0	4.0 \pm 1.1
	0.5	3.0 \pm 0.3	6.9 \pm 0.8
	1.0	3.9 \pm 0.9	5.9 \pm 0.2
	5.0	0.0	0.0
	10.0	0.0	0.0



Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los nucleótidos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (//), 0.5 mM (|||), 1.0 mM (•••), 5.0 mM (≡), 10.0 mM (◻◻). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

(8 mM) y MVA, $2\text{-}^{14}\text{C}$ - (33.3 μM , 0.5 μci).

Los resultados reflejados en la Tabla IV expresan en primer lugar que sin la suplementación de iones metálicos se produce solo una pequeña cantidad de P-MVA. Por otra parte puede observarse que en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} se incrementa fuertemente la fosforilación del MVA, si bien a pequeñas concentraciones el Mn^{2+} es mucho más efectivo que el Mg^{2+} . Sin embargo cuando aumenta la concentración de ión Mn^{2+} adicionado se observa una fuerte disminución de la cantidad de P-MVA formado mientras que en presencia de Mg^{2+} a las mismas concentraciones la formación de P-MVA continúa aumentando alcanzándose, a concentraciones 5.0 y 10.0 mM, cantidades de P-MVA mayores en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (Fig. nº 9).

La formación de PP-MVA es ligeramente superior en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} a elevadas concentraciones (5.0-10.0 mM) únicas a las que se ha puesto de manifiesto la formación de este derivado fosforilado del MVA.

En presencia de los iones metálicos Ca^{2+} y Zn^{2+} la fosforilación del MVA es muy escasa, observándose solo una pequeña cantidad de P-MVA.

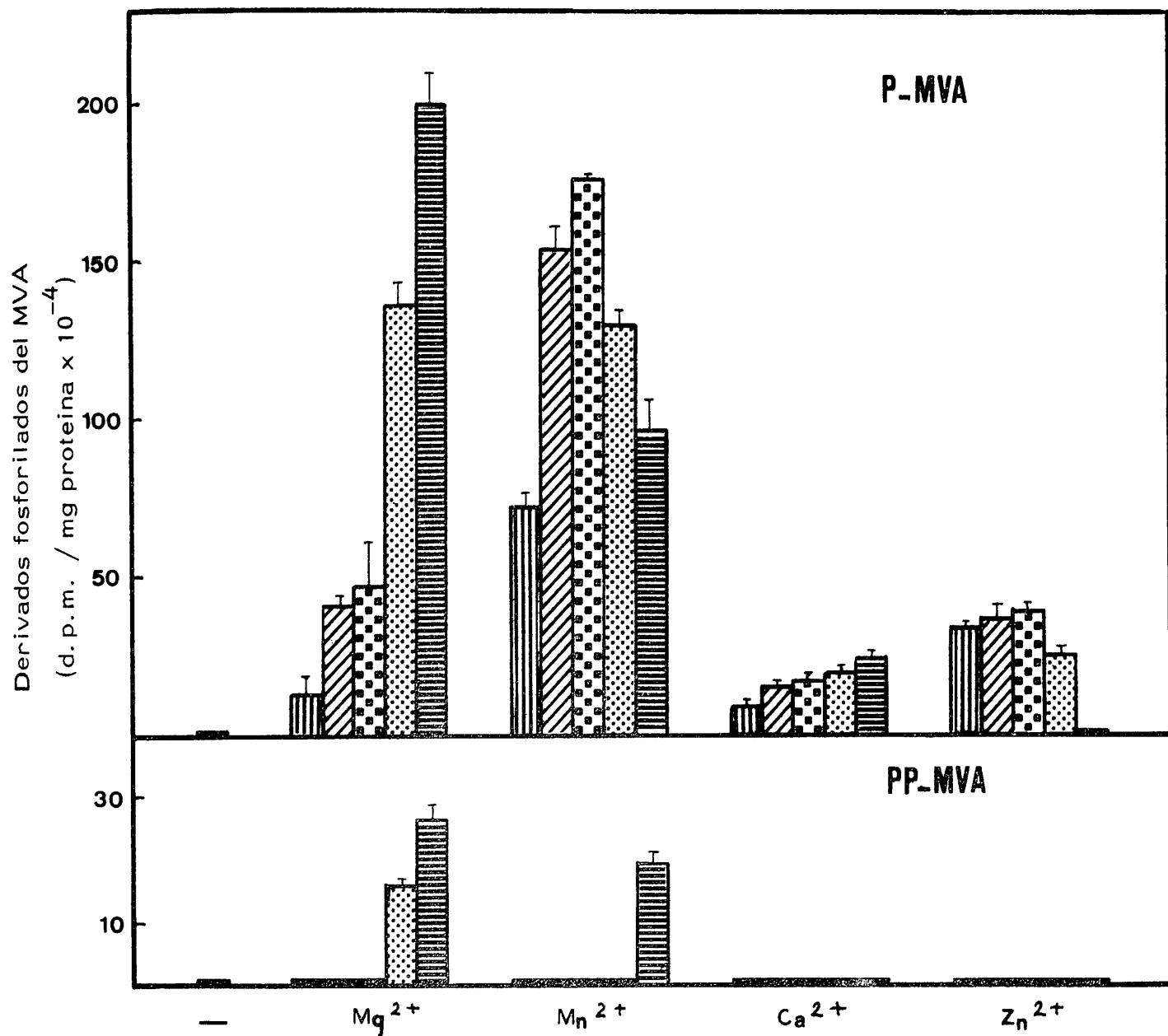
Como era de esperar en presencia de ion Hg^{2+} se obtiene la inactivación total de la fosforilación del MVA a cualquiera de las concentraciones adicionadas.

TABLA IV

Efecto de algunos cationes divalentes sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos excepto los iones metálicos cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Ión metálico	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
—	—	18.6 \pm 1.6	0.0
Mg ²⁺	0.1	12.8 \pm 6.4	0.0
	0.5	41.2 \pm 2.5	0.0
	1.0	47.3 \pm 14.2	0.0
	5.0	136.1 \pm 8.1	16.1 \pm 1.1
	10.0	200.7 \pm 10.1	26.4 \pm 5.1
Mn ²⁺	0.1	72.3 \pm 5.1	0.0
	0.5	154.0 \pm 8.1	0.0
	1.0	176.0 \pm 0.0	0.0
	5.0	129.8 \pm 4.6	0.0
	10.0	97.2 \pm 11.2	19.5 \pm 3.0
Ca ²⁺	0.1	8.9 \pm 0.7	0.0
	0.5	15.5 \pm 1.4	0.0
	1.0	16.3 \pm 2.1	0.0
	5.0	18.5 \pm 0.2	0.0
	10.0	24.4 \pm 0.7	0.0
Zn ²⁺	0.1	33.6 \pm 1.1	0.0
	0.5	37.1 \pm 4.3	0.0
	1.0	38.4 \pm 0.4	0.0
	5.0	25.6 \pm 2.9	0.0
	10.0	0.0	0.0

Figura nº 9



Efecto de los cationes divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los iones metálicos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (||||), 0.5 mM (///), 1.0 mM (□□□), 5.0 mM (⊘) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

3. 2. 1. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos -SH

Se ha estudiado la actividad de las enzimas fosforilantes de MVA en presencia de algunos protectores de grupos -SH (ditiotretol, glutatión, cisteína y mercapto-etanol) a concentraciones 0.1, 1.0 y 10.0 mM. Como puede verse en la Tabla V las cantidades de P-MVA formados no se incrementaron cuando estos reactivos se añadieron al medio estandar de la reacción enzimática e incluso se observó una ligera disminución en la formación de P-MVA en presencia de DTT y de glutatión, así como a elevadas concentraciones de cisteína.

Para el PP-MVA hay una ligera activación con DTT a las concentraciones 0.1 mM y 1.0 mM para inhibirse a 10.0 mM. Tampoco se observó cantidad alguna de PP-MVA con glutatión a cualquier concentración y con cisteína 10.0 mM.

El β -ME prácticamente no influye sobre la formación de derivados fosforilados del MVA (Fig. nº 10)

3. 2. 1. 9. -Efecto de algunos inhibidores de grupos-SH

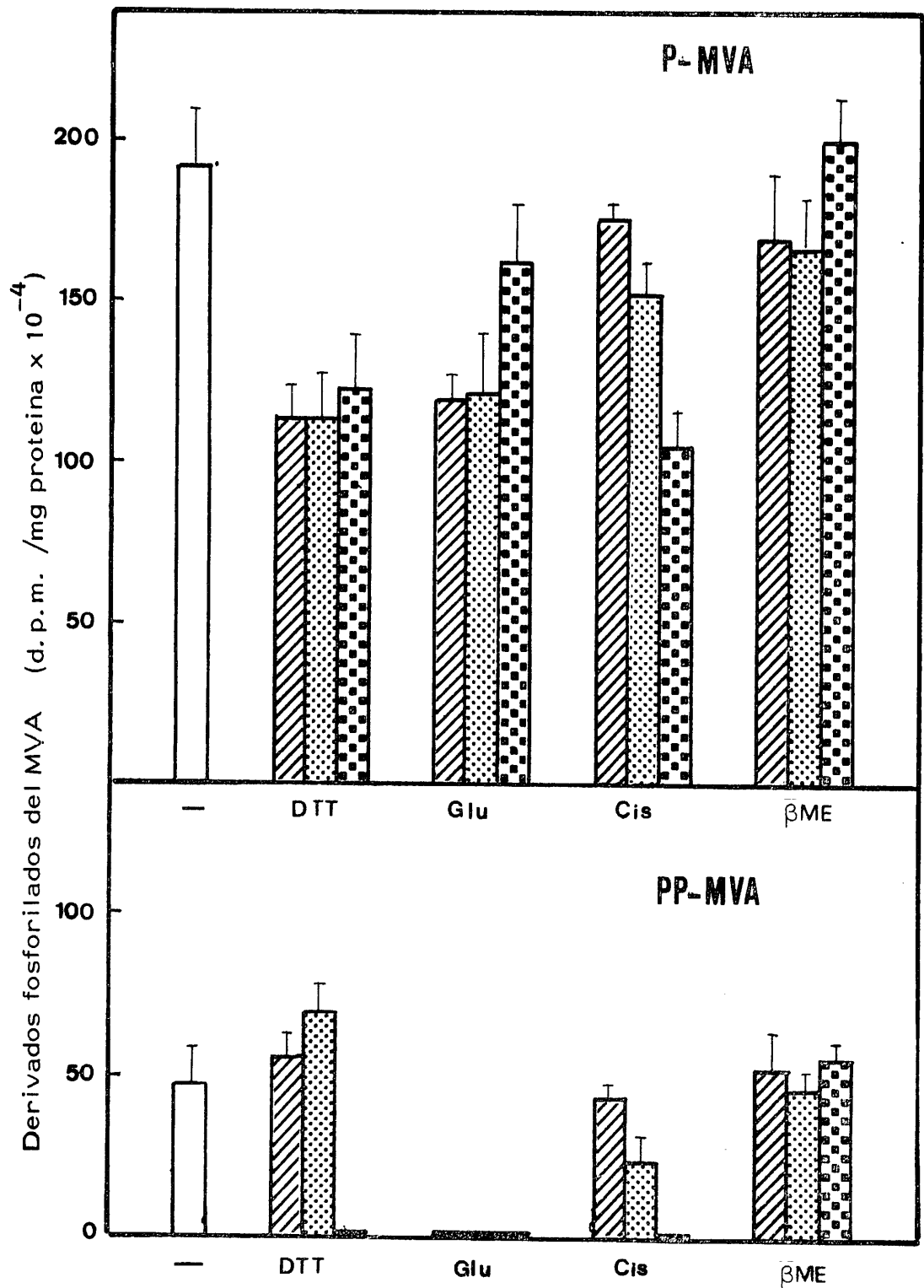
La Tabla VI nos muestra que la actividad mevalonato cinasa fué totalmente inhibida cuando se adicionó p-hidroximercuribenzoato al medio estandar de la reacción a partir de una concentración 0.01 M

En las reacciones a las que se adicionó ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), a una concentración de 1.0 mM se obtuvo aproximadamente solo el 50 % de la actividad mientras que a 10.0 mM la inhibición

TABLA V

Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estándar de los reactivos suplementada con el protector cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteína 10^{-4})								
Protector	Concentración (mM)	Nº exp.	P-MVA	t	p	PP-MVA	t	p
—	—	3	192.3 \pm 20.0			47.4 \pm 12.2		
Ditiotreitol	0.1	3	114.4 \pm 6.7	3.4	<0.02	55.5 \pm 7.8	0.5	<0.9
	1.0	3	114.4 \pm 11.0	3.2	<0.05	68.8 \pm 9.8	1.3	<0.9
	10.0	3	122.6 \pm 18.8	2.4	<0.1	0.0		
Glutation	0.1	3	118.6 \pm 7.9	3.2	<0.05	0.0		
	1.0	3	119.8 \pm 20.0	2.6	<0.05	0.0		
	10.0	3	102.0 \pm 16.4	3.5	<0.02	0.0		
Cisteina	0.1	3	174.5 \pm 4.6	0.8	<0.5	43.2 \pm 3.9	0.3	<0.9
	1.0	3	151.6 \pm 14.4	1.5	<0.2	23.6 \pm 7.8	1.6	<0.3
	10.0	3	104.7 \pm 14.5	3.3	<0.5	0.0		
Mercaptoetanol	0.1	3	169.1 \pm 20.0	0.7	<0.5	53.1 \pm 13.7	0.3	<0.9
	1.0	3	161.4 \pm 15.0	1.1	<0.5	45.2 \pm 5.9	0.1	<0.9
	10.0	3	198.6 \pm 13.6	0.2	<0.9	55.0 \pm 3.9	0.5	<0.9



Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los protectores suplementados fué: 0.1 mM (//), 1.0 mM (•••) y 10.0 mM (■). los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

TABLA VI

Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el inhibidor cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

P-MVA					
Inhibidor	Concentración (mM)	Nº exp.	d. p. m. /mg proteína 10^{-4}	t	p
—	—	3	192.0 \pm 21.4		
N-etil- maleimida	0.01	3	175.0 \pm 7.0	1.2	<0.3
	0.1	6	182.2 \pm 14.0	0.3	<0.5
	1.0	6	189.2 \pm 14.0	1.28	<0.2
	10.0	6	166.6 \pm 3.0	1.9	<0.1
p-hidroxi- -mercuri- benzoato	0.01	6	0.0		
	0.1	6	0.0		
	1.0	6	0.0		
	10.0	6	0.0		
5, 5' -ditiobis- nitrobenzoico	0.01	6	185.7 \pm 5.6	2.0	<0.1
	0.1	6	170.1 \pm 2.4	1.7	<0.1
	1.0	6	114.9 \pm 2.0	0.8	<0.3
	10.0	6	0.0		

fué total (Fig. nº 11).

La N-etilmaleimida no produjo practicamente ninguna inhibición a concentraciones semejantes a los otros agentes ensayados (0.01 -10.0 mM).

En presencia de cualquiera de los tres inhibidores ensayados a todas las concentraciones, no se observó ninguna formación de PP-MVA.

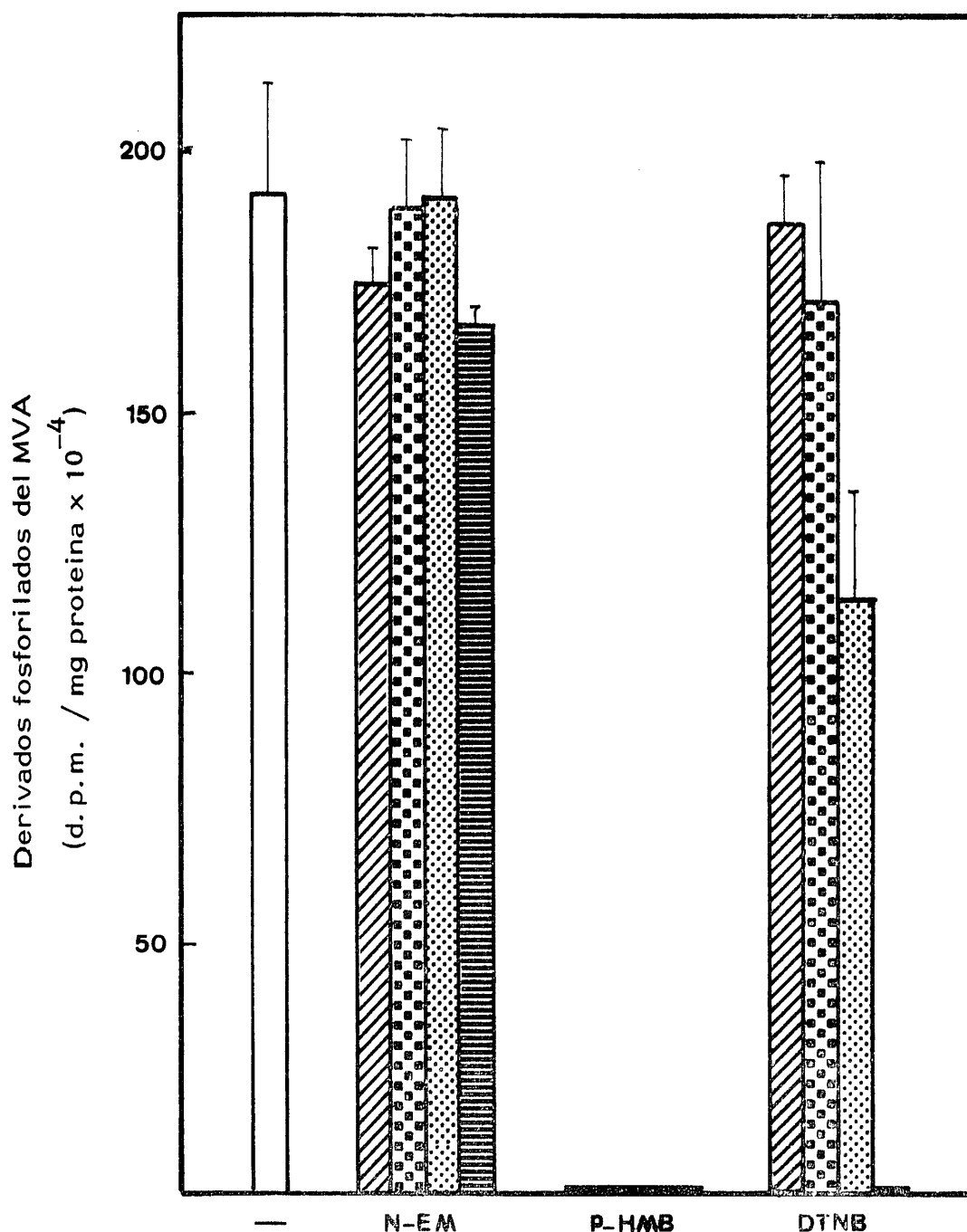
3. 2. 1. 10. - Influencia de la edad del pollo

La diferente cantidad de derivados fosforilados formados a lo largo del desarrollo durante el periodo de tiempo estudiado (de 0 a 10 días de edad) queda reflejado en la Fig. nº 12.

Como puede apreciarse en dicha figura la actividad específica se mantiene a niveles semejantes durante los cuatro primeros días de vida del pollo aunque con ligera tendencia a bajar, siendo clara la disminución de derivados fosforilados de MVA formados entre los 5 y 10 días.

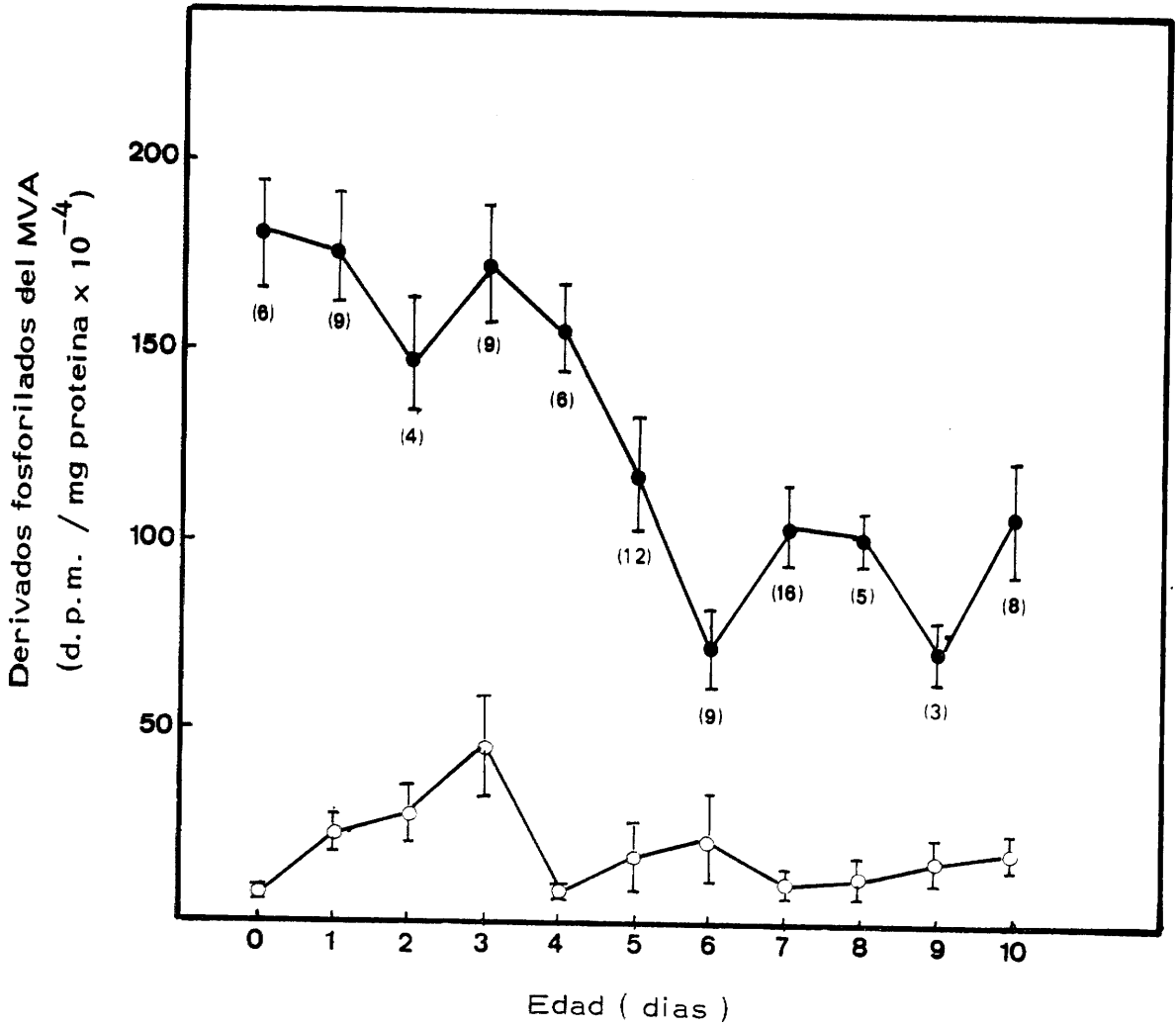
En cuanto al PP-MVA formado se observa un ligero aumento en pollos de 3 días, manteniendose prácticamente constante en el resto de las edades.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C durante 30 min. los extractos de cerebro de pollo de las distintas edades indicadas con la mezcla reactiva estandar.



Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los inhibidores suplementados fué 0.01 mM (//), 0.1 mM (■), 1.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 12



Influencia de la edad sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA (○) PP-MVA.

3. 2. 1. 11. - Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta

Con objeto de estudiar el efecto de la suplementación de colesterol a la dieta normal sobre la fosforilación del MVA, se efectuaron unas experiencias preliminares en las que pollos de 3 días fueron alimentados durante 24, 48 y 72 h con una dieta adicionada de colesterol al 5 ‰, manteniendo un lote semejante de pollos con la alimentación normal. Como puede observarse en la Tabla VII, la cantidad de P-MVA formado en pollos alimentados con dieta suplementada con colesterol parece ser ligeramente inferior a la obtenida en pollos controles.

Dada la pequeña duración del tratamiento así como los pocos días de edad de los pollos, se hicieron tres series de experiencias en las que se separaron dos lotes semejantes de pollos recién nacidos, uno de los cuales se alimentó con dieta suplementada con colesterol al 5 ‰ desde el primer momento, y el otro se mantuvo con una dieta normal (controles). Al cabo de 6 días de vida y tratamiento se sacrificaron diariamente una serie de pollos de ambos lotes, comparandose la capacidad fosforilante del MVA por extractos libres de células de cerebro. Los resultados, puestos de manifiesto en la tabla VIII, parecen indicar que no existe una influencia significativa de la suplementación con colesterol sobre la formación de P-MVA y PP-MVA. Al menos durante el periodo de tiempo ensayado (6-10 días), no se observaron claras diferencias en las cantidades de P-MVA y PP-MVA formados por los lotes control y alimentados con colesterol.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando los extractos enzimáticos de cerebro de pollo controles y tratados a 37°C durante 30 min con la mezcla reactiva estandar.

TABLA VII

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa

P - MVA observado (d. p.m. /mg proteína $\times 10^{-4}$)				
Edad (días)	horas de tratamiento	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p
6	—	164.0 \pm 10.6		
7	24	90.8 \pm 12.3	57.0 \pm 10.5	< 0.2
8	48	92.2 \pm 4.7	72.4 \pm 4.6	< 0.05
9	72	158.3 \pm 15.5	136.0 \pm 29.2	< 0.9

TABLA VIII

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. Los días que corresponden a la edad corresponden también a tiempo de tratamiento con dieta de colesterol. El \pm representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA				PP - MVA		
Edad (días)	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P
6	34.2 \pm 6.6	38.5 \pm 4.5	<0.9	4.6 \pm 2.3	0.0	
7	59.7 \pm 13.8	57.7 \pm 12.8	<0.9	4.1 \pm 0.0	11.6 \pm 4.0	<0.9
8	89.0 \pm 1.8	84.6 \pm 5.6	<0.3	17.9 \pm 3.7	14.7 \pm 5.2	<0.5
9	75.0 \pm 9.0	50.8 \pm 1.5	<0.02	17.6 \pm 5.2	11.0 \pm 1.4	<0.2
10	97.8 \pm 9.6	82.7 \pm 10.6	<0.3	7.4 \pm 1.2	18.8 \pm 8.6	<0.01

3. 2. 1. 12. - Influencia del ayuno

Se ha estudiado la posible influencia del ayuno sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Para ello, un lote de pollos de 7 días se sometió a ayuno durante 24-48 h., comparandose la capacidad fosforilante del MVA frente a otro lote de animales control de la misma edad. Como se puede observar en la Tabla IX, no se aprecian diferencias significativas en las cantidades de P-MVA y PP-MVA formados por ambos lotes de pollos.

3. 2. 1. 13. - Influencia del ritmo luz-oscuridad

Con objeto de estudiar la posible influencia del ritmo luz-oscuridad sobre las enzimas fosforilantes del MVA, se ha sometido un lote de animales a un tratamiento de 12 h de luz seguido de 12 h de oscuridad durante los primeros 7 días de vida, al cabo de los cuales se fueron sacrificando con un intervalo de 3 h. Los resultados obtenidos tras las reacciones enzimáticas llevadas a cabo con los extractos libres de células de cerebro ponen de manifiesto (Fig. nº 13) que, aunque se observaron ligeras variaciones en la cantidad de P-MVA formado, no puede deducirse la existencia de un ritmo cíclico luz-oscuridad para la fosforilación del MVA por el cerebro de pollo durante los primeros días de su desarrollo postnatal.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C durante 30 min. los extractos de cerebro de pollo extraído, a las distintas horas del día y de la noche, con la mezcla reactiva estándar.

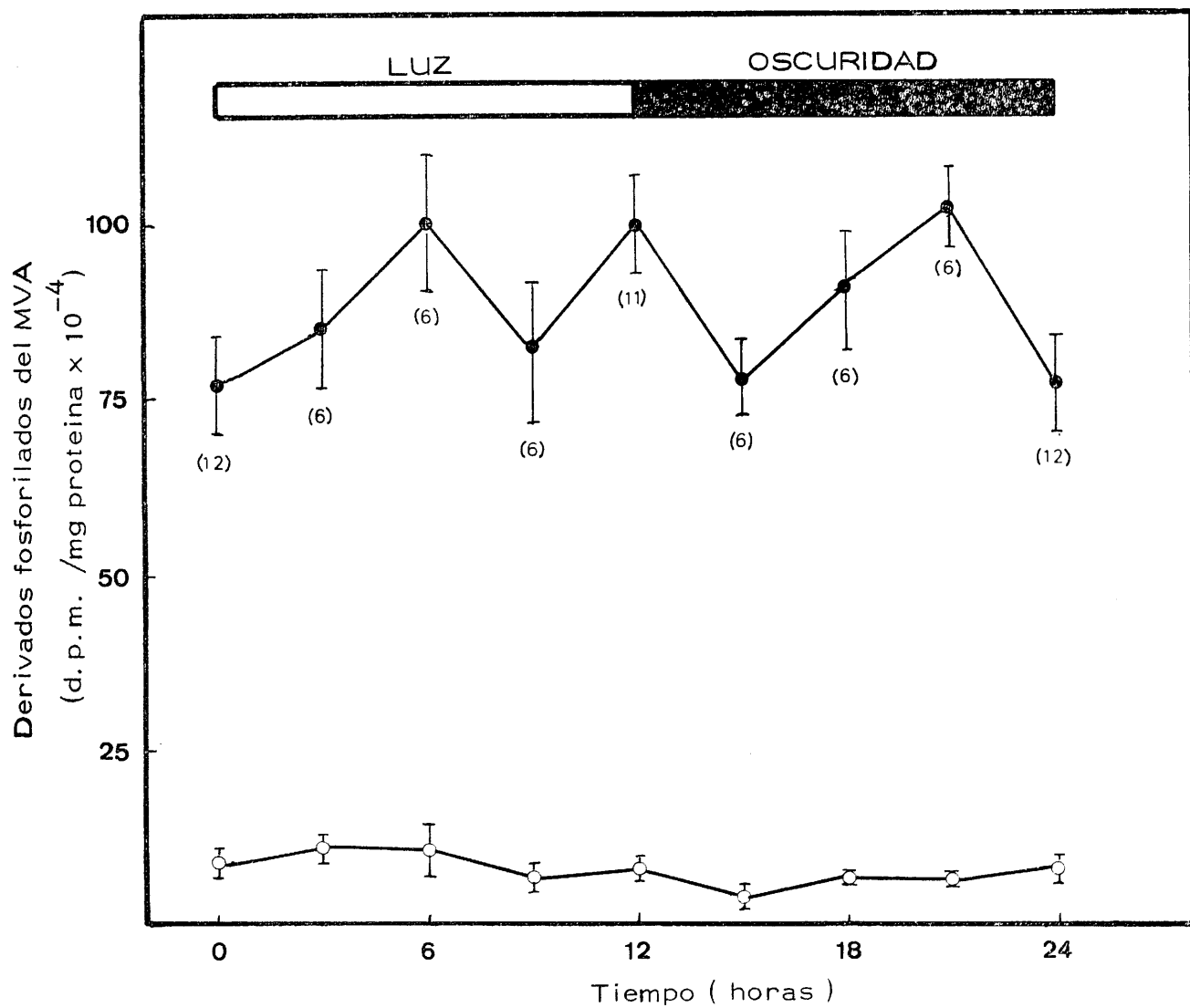
TABLA IX

Influencia del ayuno sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA			PP - MVA			
horas de ayuno	Controles	Ayunados	p	Controles	Ayunados	p
24	89.0 \pm 1.8	82.3 \pm 7.5	< 0.3	17.9 \pm 3.7	12.9 \pm 2.2	< 0.3
48	75.3 \pm 0.5	72.5 \pm 0.8	< 0.4	10.8 \pm 0.3	11.4 \pm 1.5	< 0.3



Figura nº 13



Influencia del ritmo circadiano sobre la fosforilación del MVA por extracto libres de células de cerebro de pollo con la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representa el error estandar de la media. (●) P-MVA, (○) PP-MVA.

3. 2. 2. - FOSFORILACION DEL ACIDO MEVALONICO EN RIÑON DE POLLO RECIEN NACIDO

3. 2. 2. 1. - Influencia de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

Al igual que en cerebro se comenzó el estudio de la fosforilación del ácido mevalónico en extractos libres de células de riñón de pollo hallando el rango de concentración protéica del extracto para el cual hay proporcionalidad entre cantidad de proteínas expresada en mg y actividad de fosforilante expresada en d. p. m. de derivados fosforilados.

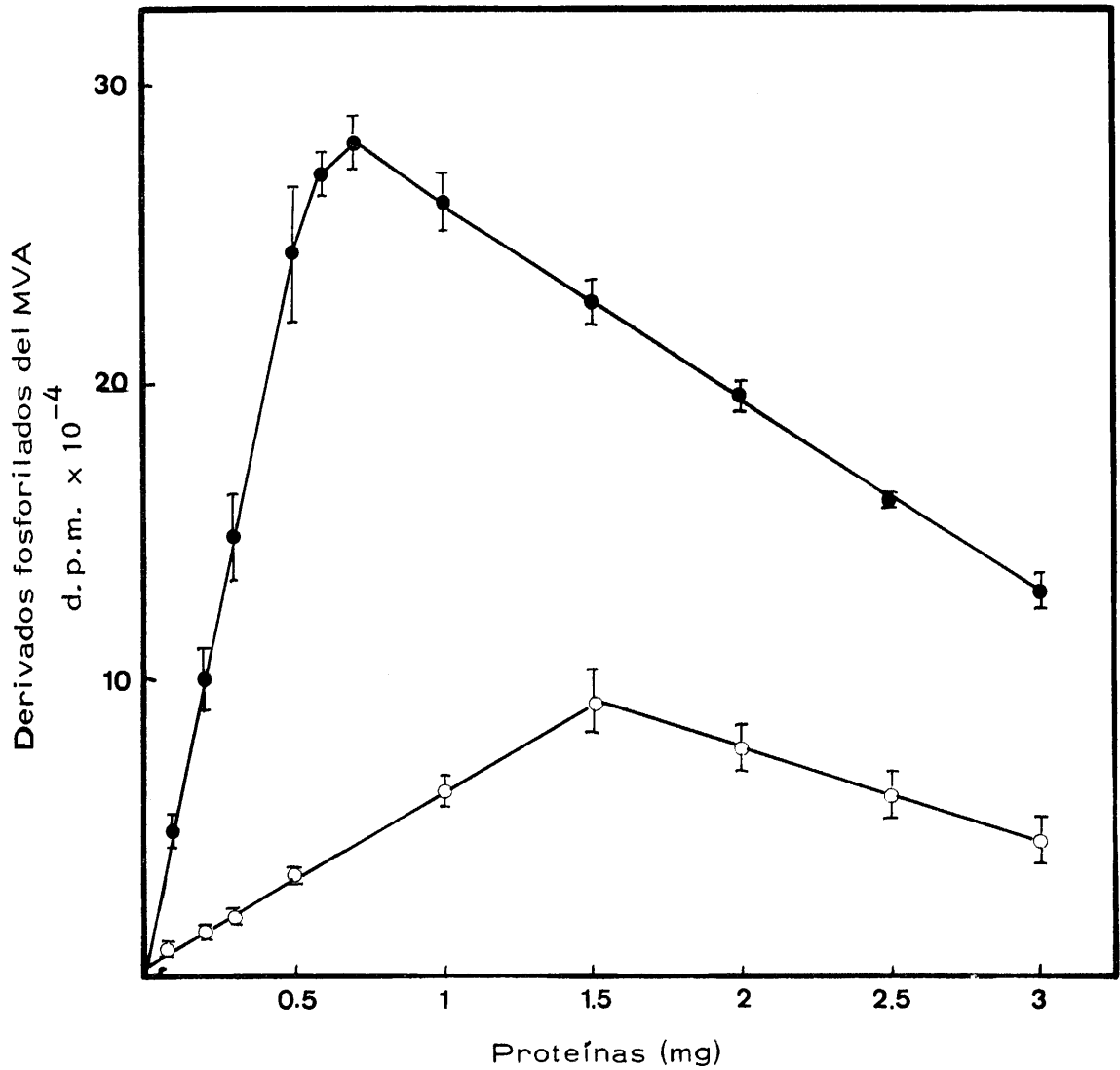
Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C durante 30 minutos en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM)-Cl₂Mg. 6 H₂O (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 μM, 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. La concentración protéica de los extractos osciló entre 0 y 3 mg de proteína.

Los resultados de estas experiencias quedan representados en la Figura nº 14 en la que se puede apreciar una rápida bajada de actividad a partir de los 0.75 mg de proteína y donde también se aprecia que la zona exponencial de la curva está comprendida entre 0 y 0.5 mg de proteína para el P-MVA y entre 0 y 1.5 para el PP-MVA.

3. 2. 2. 2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones

Se estudió la influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la producción de ácido fosfomevalónico y ácido pirofosfomevalónico.

Figura nº 14



Influencia de la concentración de proteínas de extractos libres de células de riñón de pollo, sobre la formación de de rivados del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado - (○). PP-MVA observado.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando a 37°C y en medio de tampón Tris-maleato pH 7.5 0.05 M (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM y 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. durante 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min.

Como se puede observar en la Figura nº 15 la cantidad de fosfomevalónico aumenta linealmente hasta los 30 minutos de incubación de los 30 a los 60 minutos baja la actividad y a partir de los 60 min prácticamente se mantiene constante.

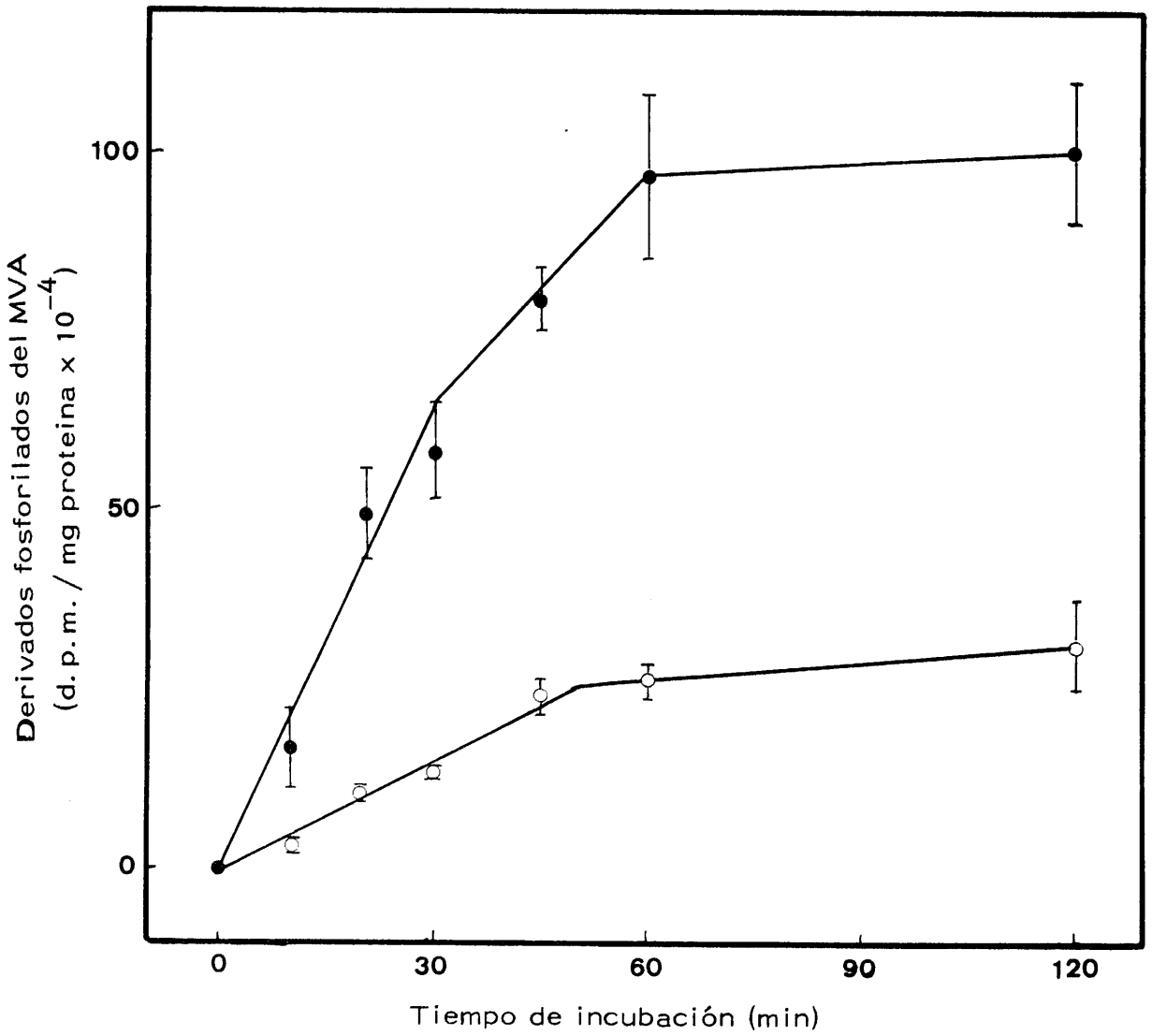
En cuanto la formación de pirofosfomevalónico puede apreciarse que es lineal hasta los 50 minutos de incubación a partir de los cuales se mantiene casi constante.

3.2.2.3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA

Se ha estudiado la variación de las actividades específicas dentro de un intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 9.5. El medio era de tampón Tris-maleato 0.05 M y pH correspondiente (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4mM), ATP (8 mM) y MVA -2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 0.5 ml.

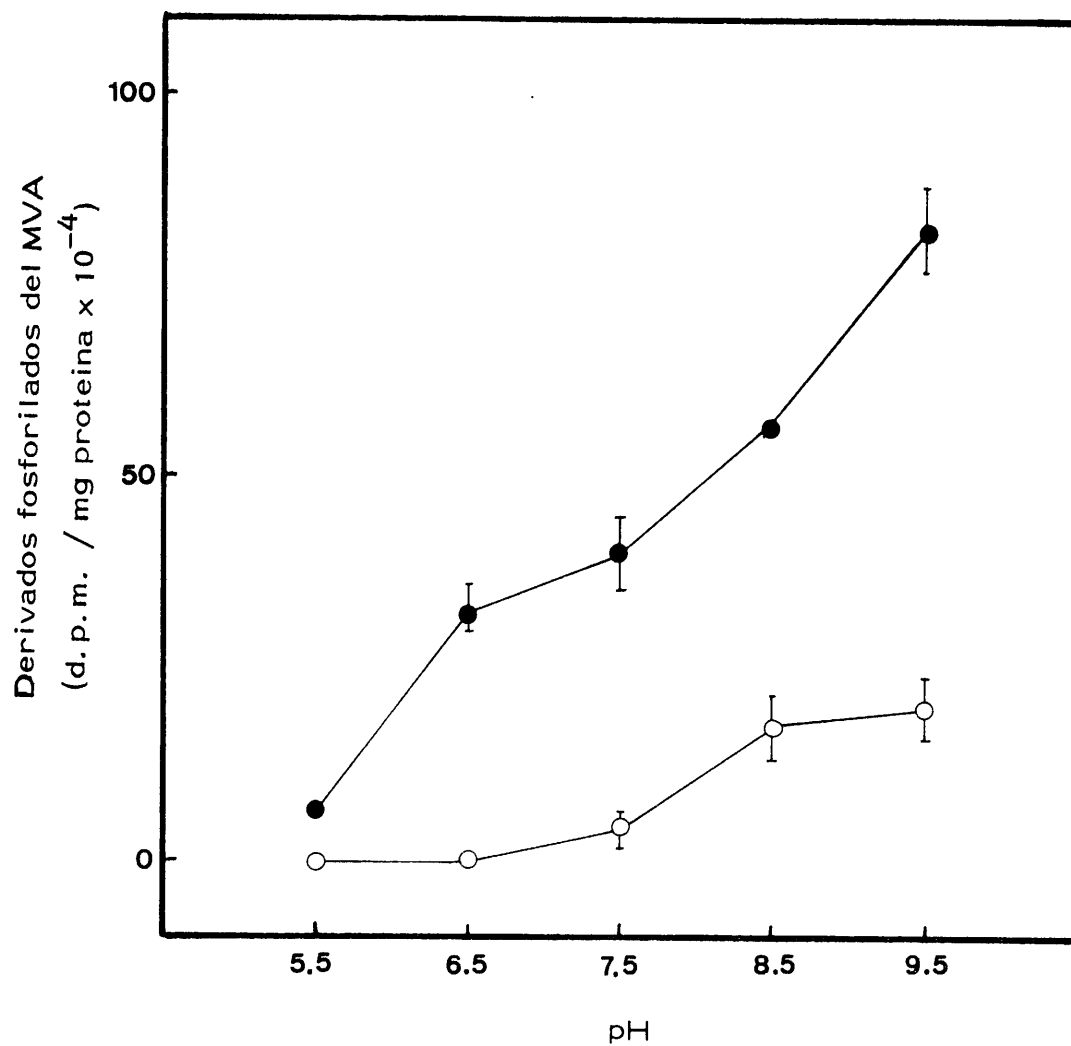
La Figura nº 16 muestra los resultados de este experimento, observándose que tanto la cantidad de P-MVA como la de PP-MVA aumenta al aumentar el pH dentro del margen ensayado alcanzándose las cantidades mayores de ambos derivados fosforilados a pH 9.5.

Figura nº 15



Influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. (●) P-MVA observado, (○) PP-MVA observado

Figura nº 16



Efecto del pH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○) PP-MVA observado.

3. 2. 2. 4. - Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico

Con objeto de estudiar la compartimentación de la fosforilación del ácido mevalónico dentro de la célula se hicieron reacciones enzimáticas utilizando como extractos enzimáticos las distintas fracciones subcelulares.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando la mezcla reactiva estandar a 37° durante 30 min.

Los resultados expresados en la Tabla X demuestran que ambas actividades enzimáticas mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa se localizan en la fracción citoplasmática, sobrenadante de 105.000 x g.

3. 2. 2. 5. - Estabilidad térmica de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa

Los extractos enzimáticos se incubaron a 50°C y 65°C a diferentes tiempos en un intervalo entre 0 y 60 min. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los extractos precalentados en medio de tampón Trís-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl₂Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 μM, 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml.

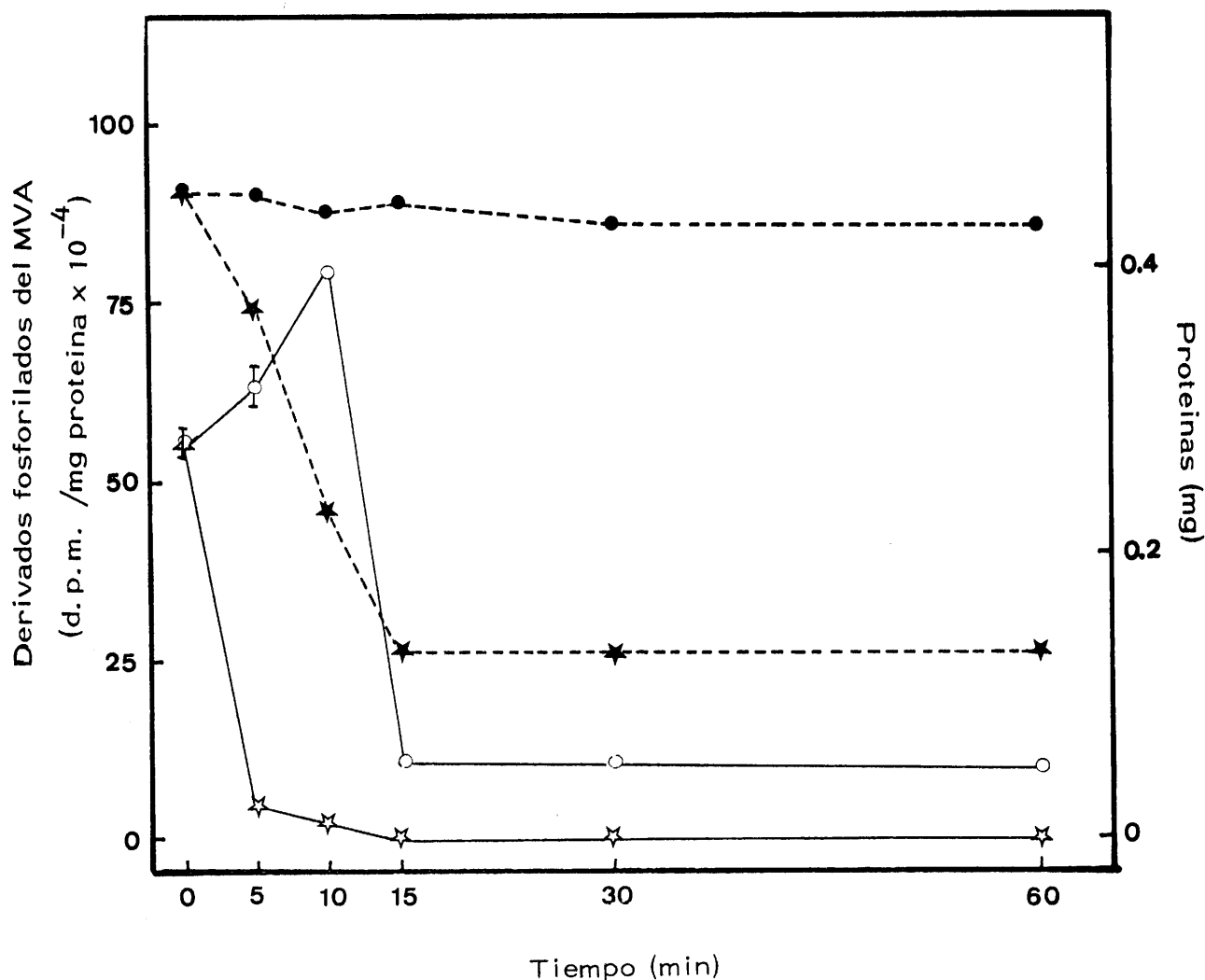
Los resultados obtenidos de estas reacciones enzimáticas representados en la Figura nº 17 muestran la inactivación total de la mevalonato cinasa al ser sometida a 65°C durante 15 min. mientras

TABLA X

Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del MVA, por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

	Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
	P - MVA	PP - MVA
Extracto libre de células	22.7 \pm 0.8	0.0
Sobrenadante 15.000 xg	45.9 \pm 3.0	3.0 \pm 0.1
Precipitado 15.000 xg	0.0	0.0
Sobrenadante 105.000 xg	86.4 \pm 2.8	3.3 \pm 0.2
Precipitado 105.000 xg	0.0	0.0

Figura nº 17



Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA. Efecto de la preincubación a distintas temperaturas de extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Los puntos unidos con líneas continuas representan la cantidad de P-MVA observado tras el mantenimiento de los extractos a 50°C (○) y a 65°C (☆). Los puntos unidos con líneas discontinuas representan la concentración protéica de los extractos tras la preincubación de los mismos a 50°C (●) y a 65°C (★).

que el tratamiento del extracto enzimático a 50°C origina un considerable aumento en la actividad de mevalonato cinasa para bajar rápidamente a los 10 min. de preincubación.

Tanto la preincubación a 50°C como a 65°C origina la total inactivación de la fosfomevalonato cinasa.

3. 2. 2. 6. - Efecto de los nucleotidos

Se ha estudiado el requerimiento nucleotídico de las enzimas fosforilantes del MVA, de riñón de pollo, para ello se hicieron reacciones enzimáticas con ATP, ITP, UTP y GTP a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM en un medio de tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), MVA-2- ^{14}C (33.3 μM y 0.5 μci).

Los resultados expresados en la Tabla XI muestran la absoluta necesidad de suplementación nucleotídica para la actividad tanto de la mevalonato cinasa como de la fosfomevalonato cinasa. Por otra parte puede observarse que es el ATP el nucleótido con el que se alcanza la máxima actividad mevalonato cinasa seguido del ITP, siendo las cantidades de P-MVA formado con UTP y GTP muy pequeñas. Para la formación de PP-MVA es también el ATP el nucleótido mas efectivo, seguido del UTP con gran diferencia, sin embargo con el ITP y GTP no se obtiene PP-MVA alguno.

TABLA XI

Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos, excepto los nucleótidos cuya concentración final fué indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Nucleótido	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
		0.0	0.0
ATP	0.1	17.7 \pm 2.8	6.1 \pm 1.2
	0.5	49.4 \pm 10.6	28.9 \pm 9.1
	1.0	64.1 \pm 10.2	37.4 \pm 8.7
	5.0	129.1 \pm 11.0	40.3 \pm 10.8
	10.0	126.2 \pm 10.1	14.4 \pm 3.6
ITP	0.1	0.0	0.0
	0.5	16.7 \pm 4.7	0.0
	1.0	40.3 \pm 4.3	0.0
	5.0	59.1 \pm 11.6	0.0
	10.0	68.7 \pm 7.7	0.0
UTP	0.1	0.0	5.9 \pm 1.2
	0.5	0.0	4.6 \pm 0.2
	1.0	5.9 \pm 1.2	4.6 \pm 0.2
	5.0	9.2 \pm 0.5	4.5 \pm 0.4
	10.0	6.7 \pm 1.8	4.5 \pm 0.4
GTP	0.1	0.0	0.0
	0.5	4.6 \pm 0.2	0.0
	1.0	7.5 \pm 1.3	0.0
	5.0	0.0	0.0
	10.0	0.0	0.0

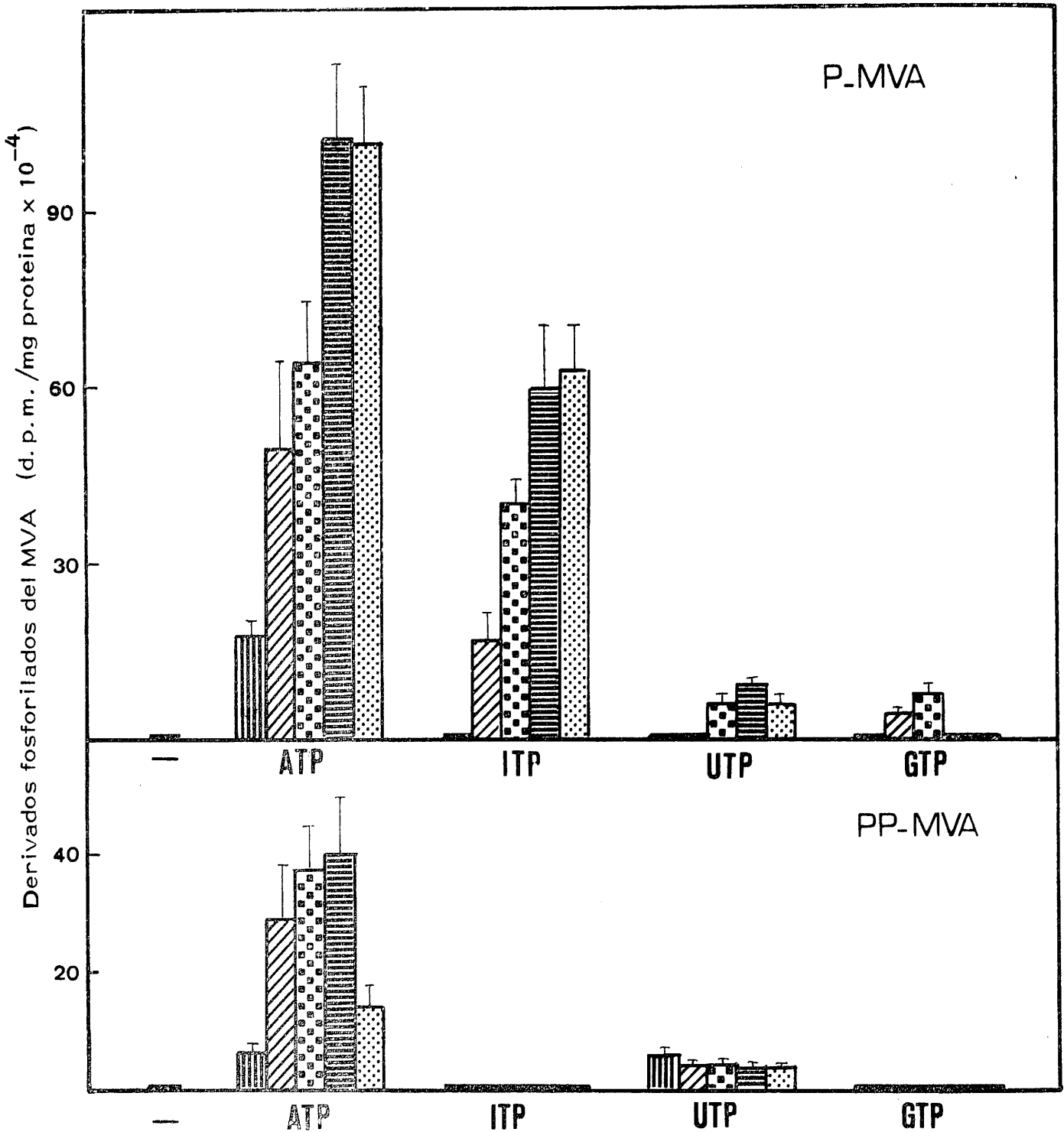
La formación de P-MVA aumenta a medida que aumenta la concentración de ATP para el que alcanza el máximo a 5.0 y 10.0 mM e ITP para el que alcanza el máximo a 10.0 mM (Fig. nº 18). Sin embargo la cantidad de PP-MVA observado llega al máximo con una concentración de ATP 5.0 mM, bajando mucho con una concentración de 10.0 mM.

3. 2. 2. 7. - Efecto de los cationes divalentes

La necesidad de la presencia de iones metálicos divalentes se puso de manifiesto en experiencias en las que el medio de reacción compuesto de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 µM 0.5 µci) se suplementó con Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺ a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM; el volumen final de la reacciones fué de 1.5 ml.

Los resultados reflejados en la Tabla XII indican en primer lugar la inactividad total de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa cuando el medio de reacción no se suplementa con ion metálico alguno. En segundo lugar puede observarse que tanto el P-MVA como el PP-MVA aparecen en mayor cantidad cuando se añade Mg²⁺ y Mn²⁺ siendo más efectivo el Mn²⁺; las cantidades de P-MVA cuando se suplementa el medio de reacción con Ca²⁺ y Zn²⁺ son muy pequeñas y las de PP-MVA nulas a todas las concentraciones ensayadas.

Con Hg²⁺ la inactivación de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa fué total.



Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los nucleótidos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (//), 0.5 mM (|||), 1.0 mM (•••), 5.0 mM (≡), 10.0 mM (◻◻). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

TABLA XII

Efecto de algunos cationes divalentes sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos excepto los iones metálicos cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Ión metálico	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
		0.0	0.0
Mg ²⁺	0.1	14.2 \pm 2.2	0.0
	0.5	24.8 \pm 2.4	0.0
	1.0	35.7 \pm 0.8	0.0
	5.0	95.5 \pm 5.2	11.9 \pm 0.6
	10.0	102.1 \pm 4.9	4.8 \pm 1.2
Mn ²⁺	0.1	55.9 \pm 10.4	0.0
	0.5	147.4 \pm 7.9	0.0
	1.0	169.0 \pm 12.1	0.0
	5.0	170.4 \pm 6.9	8.1 \pm 3.1
	10.0	70.5 \pm 12.5	3.9 \pm 1.1
Ca ²⁺	0.1	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1.0	0.0	0.0
	5.0	15.7 \pm 0.7	0.0
	10.0	17.8 \pm 0.4	0.0
Zn ²⁺	0.1	32.1 \pm 2.3	0.0
	0.5	30.0 \pm 0.0	0.0
	1.0	29.8 \pm 3.0	0.0
	5.0	17.2 \pm 0.8	0.0
	10.0	0.0	0.0

Además se observa que el P-MVA formado aumenta cuando aumenta la concentración de Mg^{2+} alcanzando la máxima cantidad a la concentración de 10.0 mM mientras que el Mn^{2+} tienen una fuerte inhibición a la concentración de 10.0 mM, alcanzando su máxima cantidad de P-MVA observado a la concentración de 5.0 mM. El PP-MVA muestra su máxima formación a concentración de 10.0 mM mientras que el Mn^{2+} tiene una fuerte inhibición a la concentración de 10.0 mM alcanzando su máxima cantidad de P-MVA observado a la concentración de 5.0 mM. El PP-MVA muestra su máxima formación a concentración 10.0 mM para ambos cationes divalentes. (Fig. nº 19)

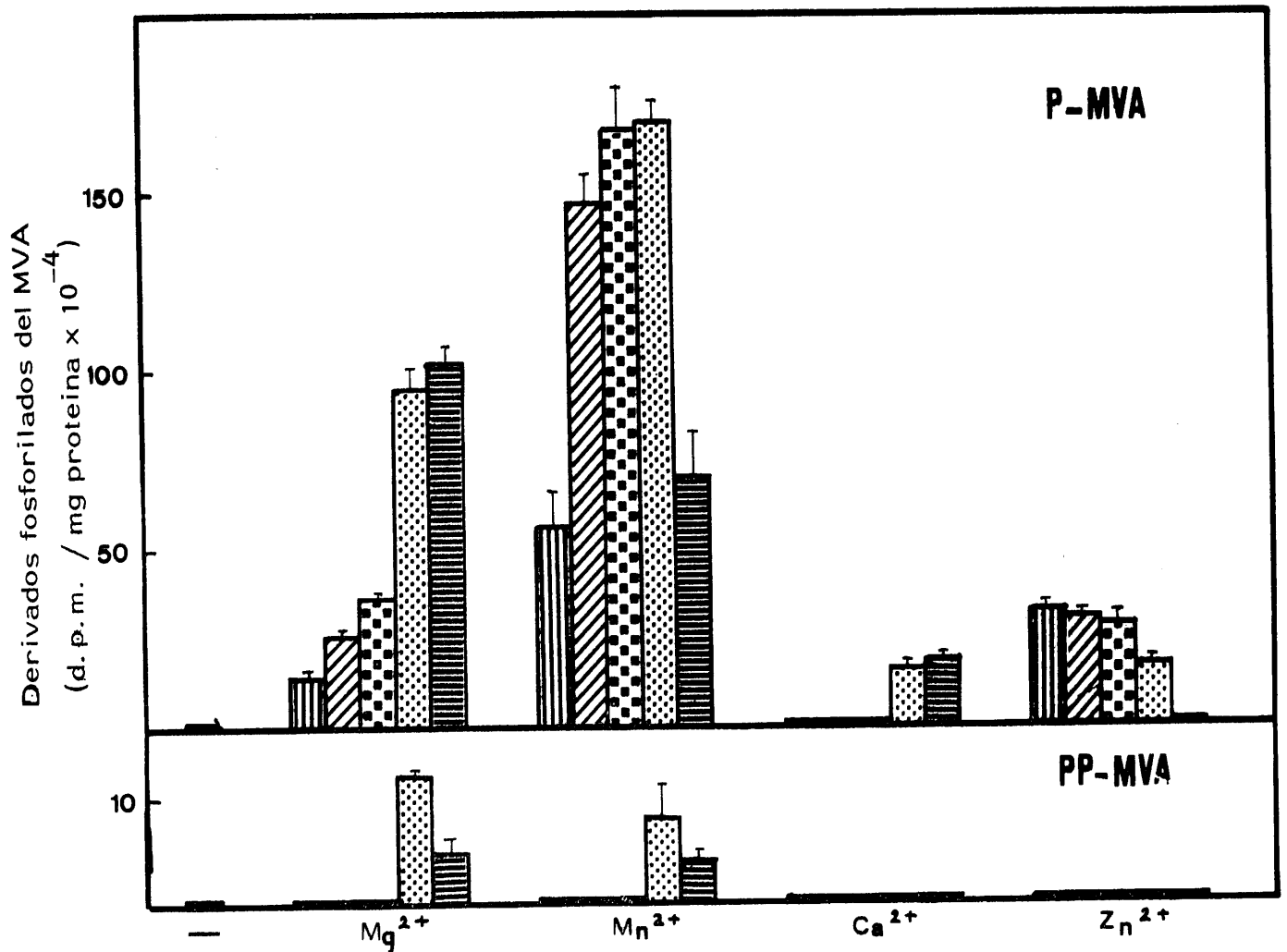
3. 2. 2. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos -SH

Se ha estudiado la actividad de las enzimas fosforilantes de MVA en presencia de algunos protectores de grupos -SH (ditiotreitól, glutatión, cisteína y mercaptoetanol) a concentraciones 0.1, 1.0 y 10.0 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C, durante 30min el extracto enzimático de riñón de pollo junto con Tampón Trfs-maleato 0.05 M, pH 7.5, $Cl_2 Mg \cdot 6H_2O$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA -2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml

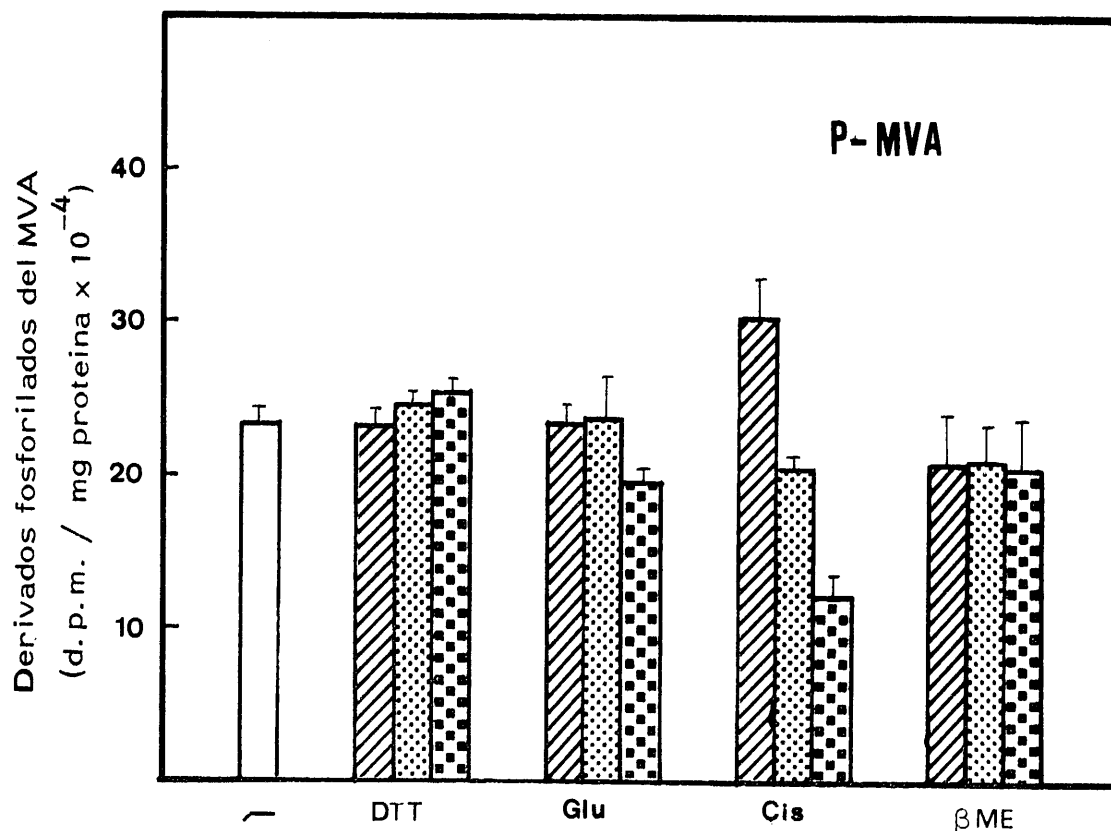
Como se observa en la Fig. nº 20 ninguno de los protectores de grupos -SH ensayados tiene un efecto activador sobre la mevalonato cinasa, incluso puede apreciarse una pequeña inhibición significativa con cisteína 10.0 mM (Tabla XIII). Con DTT y βME la actividad

Figura nº 19



Efecto de los cationes divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los iones metálicos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (||||), 0.5 mM (///), 1.0 mM (■), 5.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 20



Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los protectores suplementados fué: 0.1 mM (//), 1.0 mM (•••) y 10.0 mM (◻◻). los resultados se expresan como la media de tres experiencias Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

TABLA XIII

Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el protector cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

(d.p.m./mg proteína 10^{-4})					
Protector	Concentración (mM)	Nº exp.	P-MVA	t	p
—	—	3	23.1 \pm 2.5		
Ditiotreitol	0.1	3	23.1 \pm 3.0	0.0	<0.9
	1.0	3	24.5 \pm 1.8	0.4	<0.5
	10.0	3	25.3 \pm 1.5	0.7	<0.5
Glutation	0.1	3	23.1 \pm 1.3	0.0	<0.9
	1.0	3	23.8 \pm 3.2	0.17	<0.9
	10.0	3	19.5 \pm 1.1	1.3	<0.2
Cisteina	0.1	3	30.3 \pm 2.3	2.0	<0.1
	1.0	3	20.6 \pm 1.0	0.8	<0.5
	10.0	3	12.2 \pm 1.4	3.7	<0.02
Mercaptoetanol	0.1	3	20.9 \pm 3.5	0.5	<0.5
	1.0	3	20.9 \pm 2.8	0.5	<0.5
	10.0	3	20.8 \pm 3.0	0.5	<0.5

se mantienen prácticamente igual a los controles, con Glutathion hay una pequeña inhibición no significativa a la concentración 10.0 mM y con cisteína hay un pequeño aumento no significativo seguido de inhibición a 5.0 mM y 10.0 mM, siendo significativa la inhibición a 10.0 mM como ya se ha indicado.

A ninguna de las concentraciones ensayadas de protectores de grupos -SH se observó formación de PP-MVA

3.2.2.9. - Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH

Se hicieron las mismas experiencias que en el apartado anterior, pero añadiendo en lugar de protectores, inhibidores de grupos -SH (n-etil-maleimida, p-hidroximercuribenzoato y 5,5'-ditiobis nitrobenzoico) a concentraciones 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mM.

La Tabla XIV muestra la existencia de inhibición total para el p-hidroximercuribenzoato a partir de 0.1 mM y de una inhibición significativa (50%) con el 5,5'-ditiobisnitrobenzoico a partir de 1.0 mM.

La n-etil-maleimida no ejerce inhibición ninguna e incluso a 1.0 mM aumenta un poco la actividad con respecto a los controles (Fig. nº 21).

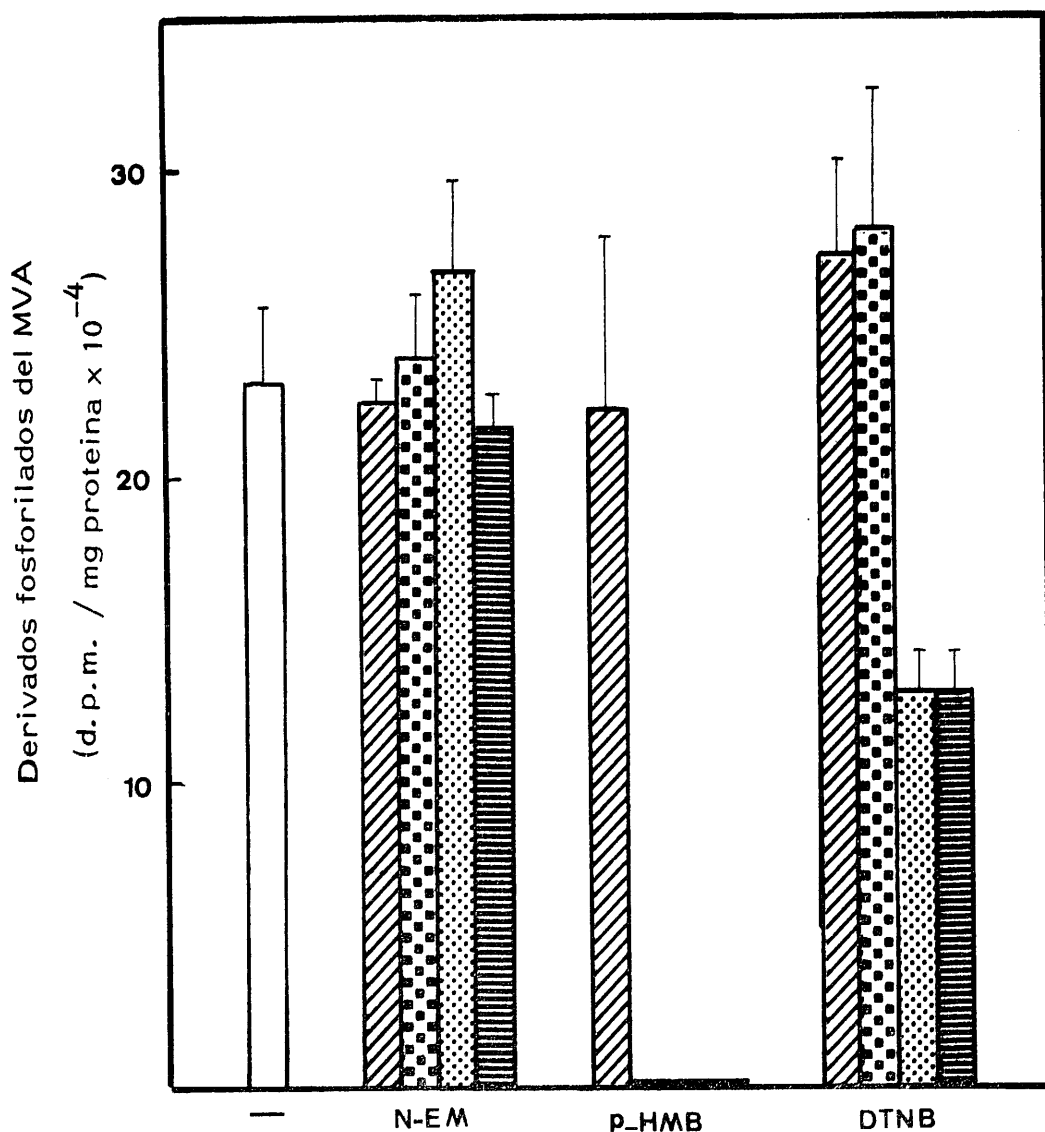
En presencia de los tres inhibidores ensayados a cualquiera de las concentraciones, no se observó ninguna formación de PP-MVA

TABLA X IV

Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el inhibidor cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

P-MVA					
Inhibidor	Concentración (mM)	Nº exp.	d. p. m. /mg proteína 10^{-4}	t	p
—	—	3	23.1 ± 2.5		
N-etil-maleimida	0.01	3	22.0 ± 0.3	0.2	<0.5
	0.1	3	23.9 ± 2.1	0.2	<0.5
	1.0	3	26.7 ± 3.0	0.9	<0.3
	10.0	3	21.6 ± 1.1	0.5	<0.5
p-hidroximercuribenzoato	0.01	3	22.3 ± 5.5	0.1	<0.9
	0.1	3	0.0		
	1.0	3	0.0		
	10.0	3	0.0		
5,5'-ditiobisnitrobenzoico	0.01	3	27.4 ± 3.1	1.0	<0.3
	0.1	3	28.1 ± 4.3	0.9	<0.3
	1.0	3	13.0 ± 1.2	3.6	<0.05
	10.0	3	13.0 ± 1.2	3.7	<0.05

Figura nº 21



Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los inhibidores suplementados fué 0.01 mM (//), 0.1 mM (■) 1.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

3. 2. 2. 10. - Influencia de la edad del pollo

Se estudió la incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA a lo largo del desarrollo postnatal del pollo (de 0 a 10 días)

Las reacciones se llevaron a cabo incubando con la mezcla reactiva estandar, los extractos de riñón de pollo de las distintas edades a 37 °C durante 30 min. Como puede apreciarse en la Figura nº 22 se observó cantidades superiores de P-MVA de los 0 a los 4 días, con bastante diferencia, con las edades de 5 a 10 días de actividades aproximadamente 3 veces inferiores a las edades anteriormente citadas. Para el PP-MVA puede apreciarse una subida en las edades de 1, 2 y 3 días, siendo para el resto de las edades muy pequeña la actividad con una ligera tendencia a subir a partir del 6º día.

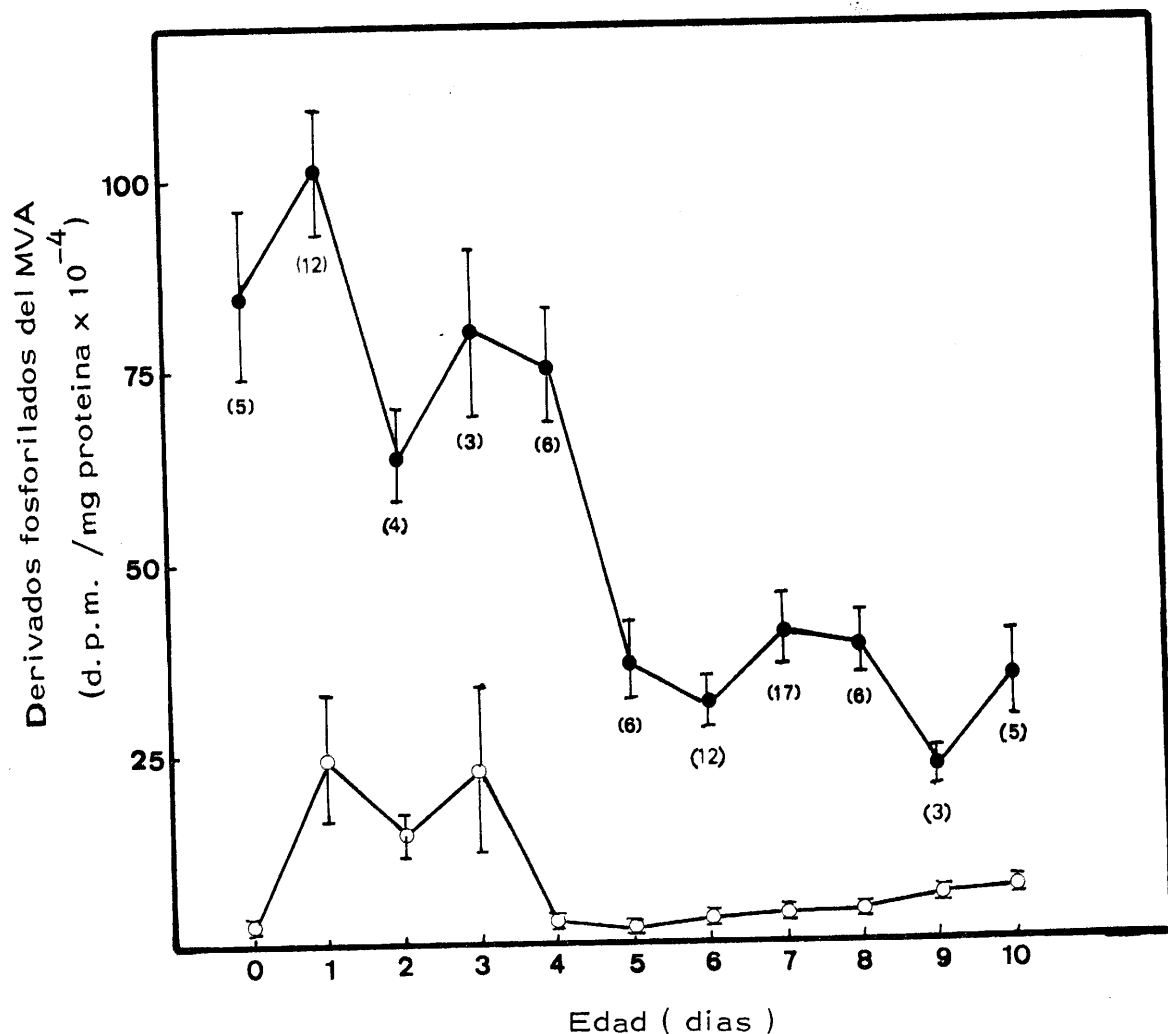
3. 2. 2. 11. - Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta.

Se hicieron las mismas experiencias descritas en el apartado 3. 2. 1. 11 con objeto de ver el efecto producido por la dieta de colesterol sobre la fosforilación del MVA por extractos de riñón de pollo.

En la Tabla nº XV se expresa las cantidades de P-MVA que son prácticamente iguales en los pollos controles que en los tratados.

En la segunda serie de experiencias se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla XVI en la que puede verse que tanto los pollos controles como los tratados tienen la misma cantidad de derivados fosforilados. Demostrándose así que, al menos en las edades estudiadas

Figura nº 22



Influencia de la edad sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA (○) PP-MVA.

TABLA XV

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

		P - MVA observado (d.p.m. / μg proteína $\times 10^{-4}$)		
Edad (días)	horas de tratamiento	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p
6		72.5 \pm 6.1		
7	24	52.5 \pm 9.3	75.6 \pm 9.0	< 0.2
8	48	44.5 \pm 2.5	44.6 \pm 2.4	< 0.9
9	72	60.0 \pm 2.9	64.4 \pm 5.2	< 0.9

TABLA XVI

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. Los días que corresponden a la edad, corresponden también a tiempo de tratamiento con dieta de colesterol. El \pm representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA				PP - MVA		
Edad (días)	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P
6	18.2 \pm 2.0	20.7 \pm 2.3	< 0.01	8.7 \pm 0.0	3.1 \pm 0.2	< 0.3
7	15.2 \pm 0.6	14.8 \pm 6.1	< 0.9	0.0	0.0	
8	38.1 \pm 5.7	35.3 \pm 1.3	< 0.5	5.7 \pm 0.7	5.8 \pm 0.6	< 0.9
9	23.9 \pm 1.6	22.2 \pm 2.3	< 0.3	5.7 \pm 0.7	5.9 \pm 0.6	< 0.5
10	29.9 \pm 3.0	35.3 \pm 9.1	< 0.1	5.5 \pm 0.2	8.0 \pm 2.0	< 0.2

la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa de riñón de pollo no tienen inhibición feed-back por colesterol.

3. 2. 2. 12. - Influencia del ayuno

Se ha estudiado la posible influencia del ayuno sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Se hicieron las mismas experiencias que en el apartado 3. 2. 1. 12 cuyos resultados quedan expresados en la Tabla XVII. Tanto los pollos ayunados como los controles no muestran la misma cantidad de P-MVA y PP-MVA formado.

3. 2. 2. 13. - Influencia del ritmo luz- oscuridad

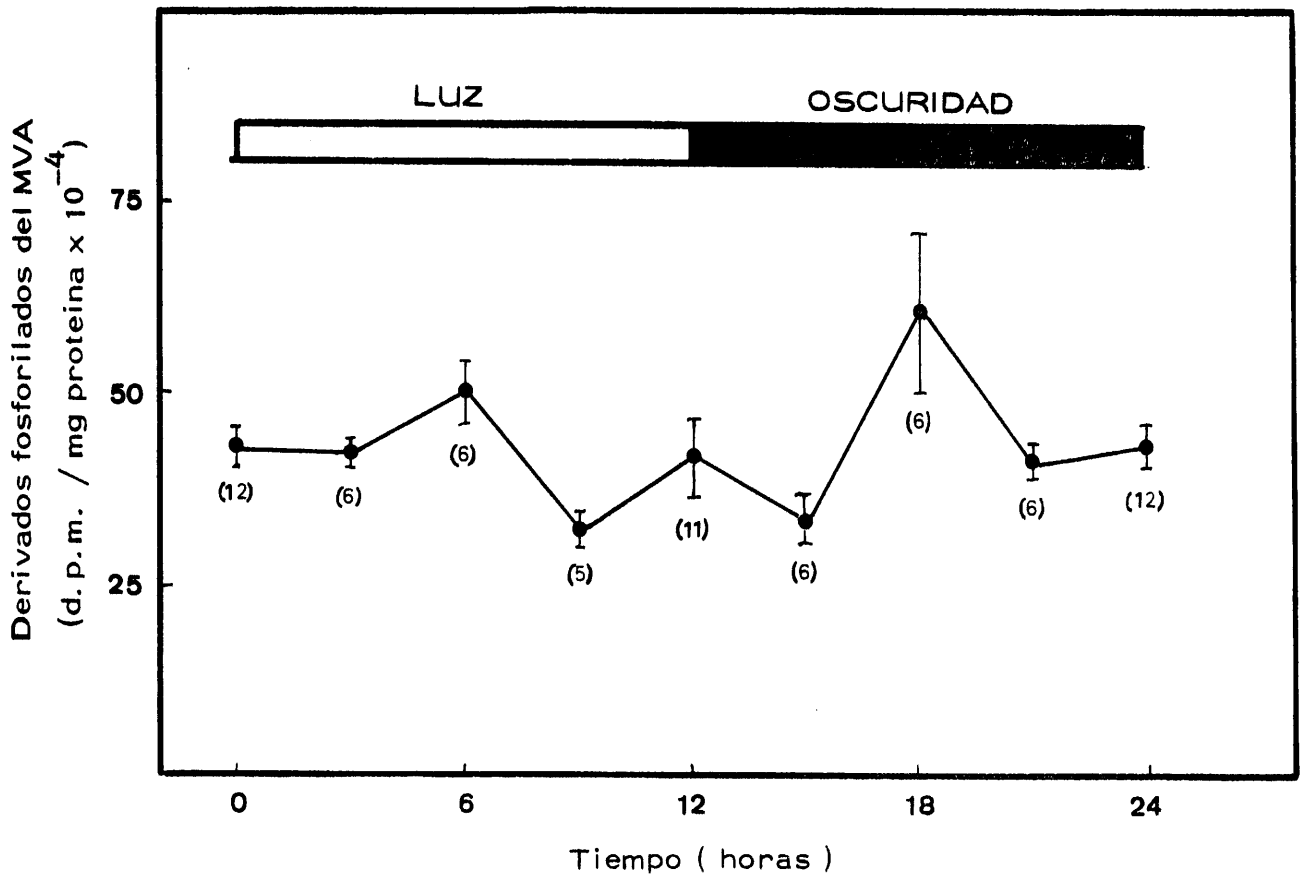
Con objeto de comprobar si las enzimas fosforilantes del MVA de riñón de pollo están influidos en su actividad por el ritmo luz-oscuridad se hicieron el tipo de experiencias descritas en el apartado 3. 2. 1. 13. cuyos resultados representados en la Figura nº 23 demostrando que las pequeñas variaciones obtenidas no son suficientes como para deducir la existencia de ritmo luz-oscuridad al menos en los primeros días del desarrollo postnatal del pollo.

TABLA XVII

Influencia del ayuno sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA			PP - MVA			
horas de ayuno	Controles	Ayunados	p	Controles	Ayunados	p
24	38.1 \pm 5.7	41.5 \pm 4.2	< 0.5	5.7 \pm 0.7	6.7 \pm 0.8	< 0.3
48	23.9 \pm 1.6	25.7 \pm 2.5	< 0.5	5.7 \pm 0.7	6.8 \pm 0.8	< 0.3

Figura nº 23



Influencia del ritmo circadiano sobre la fosforilación del MVA por extracto libres de células de riñón de pollo con la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representa el error estandar de la media. (●) P-MVA

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It then proceeds to describe the methodology used, including the data collection and analysis techniques. The results of the study are presented in the following section, followed by a discussion of the findings and their implications. The paper concludes with a summary of the main points and a list of references.

IV. - DISCUSSION

IV. - DISCUSION

Las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico constituyen un cauce común mediante el cual este ácido va a dar lugar al isopentenil pirofosfato, unidad básica de cinco átomos de carbono, de la cual van a derivar los diferentes compuestos bioquímicos conocidos genéricamente con el nombre de compuestos isoprenoides. La primera hipótesis sobre la biosíntesis de los isoprenoides se debe a Ruzicka (156), quien en 1953 supuso ya un papel fundamental para el isopentenil pirofosfato. Su formación ocurre a través de los dos derivados fosforilados del ácido mevalónico: fosfomevalónico y pirofosfomevalónico, originados en sendas reacciones enzimáticas catalizadas, respectivamente, por la mevalonato cinasa y por la fosfomevalonato cinasa. La distribución universal de esta ruta biosintética hace que estas enzimas hayan sido estudiadas en diversos orígenes. Aunque su funcionamiento en aves era previsible, no se había intentado aun poner de manifiesto las posibles particularidades de estas reacciones. En este sentido, comenzamos en nuestro Departamento el estudio de la fosforilación "in vitro" del ácido mevalónico por preparaciones enzimáticas de hígado de pollo durante los primeros días de su desarrollo postnatal, estudio que hemos completado en el presente trabajo mediante el reconocimiento de la contribución que, otros dos órganos como el cerebro y el riñón, presentan al funcionamiento de la mencionada ruta biosintética.

En efecto, el papel del cerebro en la biosíntesis de los derivados isoprenoides, y más concretamente del colesterol, está ila-

mado a ser fundamental habida cuenta de que la mielina contiene colesterol, fosfatidil derivados, cerebrosidos y esfingomielina en una proporción molar aproximada de 10: 8 : 3: 1.

Por otra parte, el hecho de que en rata más de la mitad del mevalónico incorporado mediante el llamado "shunt" a compuestos no esteroídicos sea metabolizado por el riñón, hace de este órgano un instrumento fundamental para el estudio del metabolismo del ácido mevalónico, y más concretamente, de sus reacciones de fosforilación, etapas comunes para la síntesis de compuestos isoprenoides y no isoprenoides.

Los primeros trabajos a realizar dentro del tema propuesto consistían en poner de manifiesto las actividades enzimáticas en reacciones llevadas a cabo "in vitro", mediante el reconocimiento y medida de los productos formados en las mismas a partir del ácido mevalónico. Este compuesto comercializado con marcaje isotópico en los carbonos nº 1 ó nº 2, constituyen en instrumento apropiado para su utilización como sustrato de las reacciones en estudio, ya que sus derivados fosforilados aparecerán también marcados en los mismos átomos de carbono. Por otra parte, cuando el MVA-1-¹⁴C se usa como sustrato, solo aparecerán marcados los derivados P-MVA y PP-MVA, mientras que el producto de la siguiente reacción, el isopentenil pirofosfato, no tendrá en su molécula átomo alguno de ¹⁴C, por haberse eliminado el que ocupaba la posición nº 1 del sustrato en la reacción de descarboxilación que ha conducido al mismo. Sin embargo, cuando el sustrato es el MVA-2-¹⁴C, el isopentenil

pirofosfato también aparece marcado, lo cual permite su identificación radioisotópica.

El sistema comúnmente utilizado para la identificación de los derivados del MVA es la cromatografía en papel, empleando diversos líquidos de desarrollo. Cada uno de estos presenta ciertas particularidades sobre los productos de las reacciones enzimáticas, por lo que, tras un amplio trabajo realizado anteriormente en nuestro Departamento (157) hemos seleccionado el más ventajoso para la identificación del P-MVA y del PP-MVA estableciéndose las condiciones en que se reducen al mínimo las posibles reacciones de hidrólisis que pueden afectar al significado de los resultados obtenidos.

En todas las experiencias recogidas en la presente Memoria solo se han detectado, como productos de las reacciones enzimáticas, el P-MVA y el PP-MVA. La utilización del MVA-2-¹⁴C como sustrato hubiera permitido la visualización del isopentenil pirofosfato, caso de haberse originado. El hecho de que en ningún caso se ha detectado este compuesto con los valores de R_f señalados en la bibliografía para el mismo, hace pensar en una débil o nula actividad de la pirofosfomevalonato descarboxilasa en las condiciones en que se han llevado a cabo las reacciones "in vitro".

Asimismo hemos de destacar el hecho de que se han estudiado simultáneamente las reacciones catalizadas por la mevalonato cinasa y por la fosfomevalonato cinasa, ya que se ha utilizado como sustrato

Único el MVA, el cual resulta transformado en P-MVA por la primera de las enzimas mencionadas, sirviendo a su vez como sustrato de la segunda de las enzimas que lo transforma en PP-MVA. Esto lleva consigo el que la cantidad de P-MVA que se ha originado por acción de la mevalonato cinasa sea la observada cromatográficamente como tal, más la que se ha transformado en PP-MVA por acción de la fosfomevalonato cinasa. Aunque ambas actividades específicas deberían expresarse en moles ó μ moles de producto formado por mg de proteína enzimática, normalmente se expresan en d.p.m. por mg de proteína, si bien conviene tener en cuenta que la actividad mevalonato cinasa vendrá dada por la suma de las d.p.m. de P-MVA observado más las d.p.m. de PP-MVA, mientras que la actividad fosfomevalonato cinasa viene dada sólo por las d.p.m. de PP-MVA observado. Con objeto de simplificar los cálculos, los resultados recogidos en la presente Memoria se expresan en d.p.m. de cada uno de los derivados fosforilados, tal como se determinan radiocromatográficamente, resultados que son proporcionales y fácilmente transformados en nmoles dado que se conoce la radiactividad específica del MVA y, por tanto, de sus derivados fosforilados.

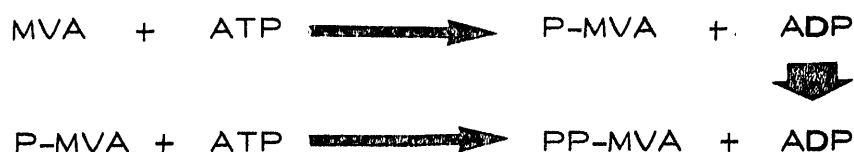
La observación de la cantidad de P-MVA y especialmente de PP-MVA originados en cada serie de experiencias pone de manifiesto una amplia variación numérica, variación que es debida principalmente a la distinta edad de los animales utilizados. En efecto, como veremos posteriormente, se ha demostrado que la edad de los pollos, entre 1-10 días, influyen poderosamente sobre la capacidad fosforilante del MVA tanto en el cerebro como en el riñón. El hecho de poder disponer en cualquier momento de animales comprendidos entre los límites de edad reseña-

dos nos facilitó la realización del presente trabajo, evitando la necesidad de utilizar siempre pollos de una misma edad, lo cual hubiera llevado consigo el trabajar solo en un determinado día de la semana, dada las características de la granja suministradora de los animales. En cualquier caso, los resultados presentados en esta Memoria son totalmente comparativos para cada serie de experiencias, lo cual nos ha permitido deducir las conclusiones correspondientes sobre la influencia de los diferentes efectores ensayados.

Una de las características observadas en todas las experiencias realizadas, tanto con preparaciones enzimáticas de cerebro como con las del riñón, es que la cantidad de P-MVA observado es muy superior a la de PP-MVA, lo cual parece indicar que, al menos en las condiciones utilizadas por nosotros, la actividad mevalonato cinasa es muy superior a la fosfomevalonato cinasa. La única ocasión en que parece formarse una cantidad elevada de PP-MVA es en presencia de bajas concentraciones de nucleótidos, especialmente ATP 0.5-1.0 mM.

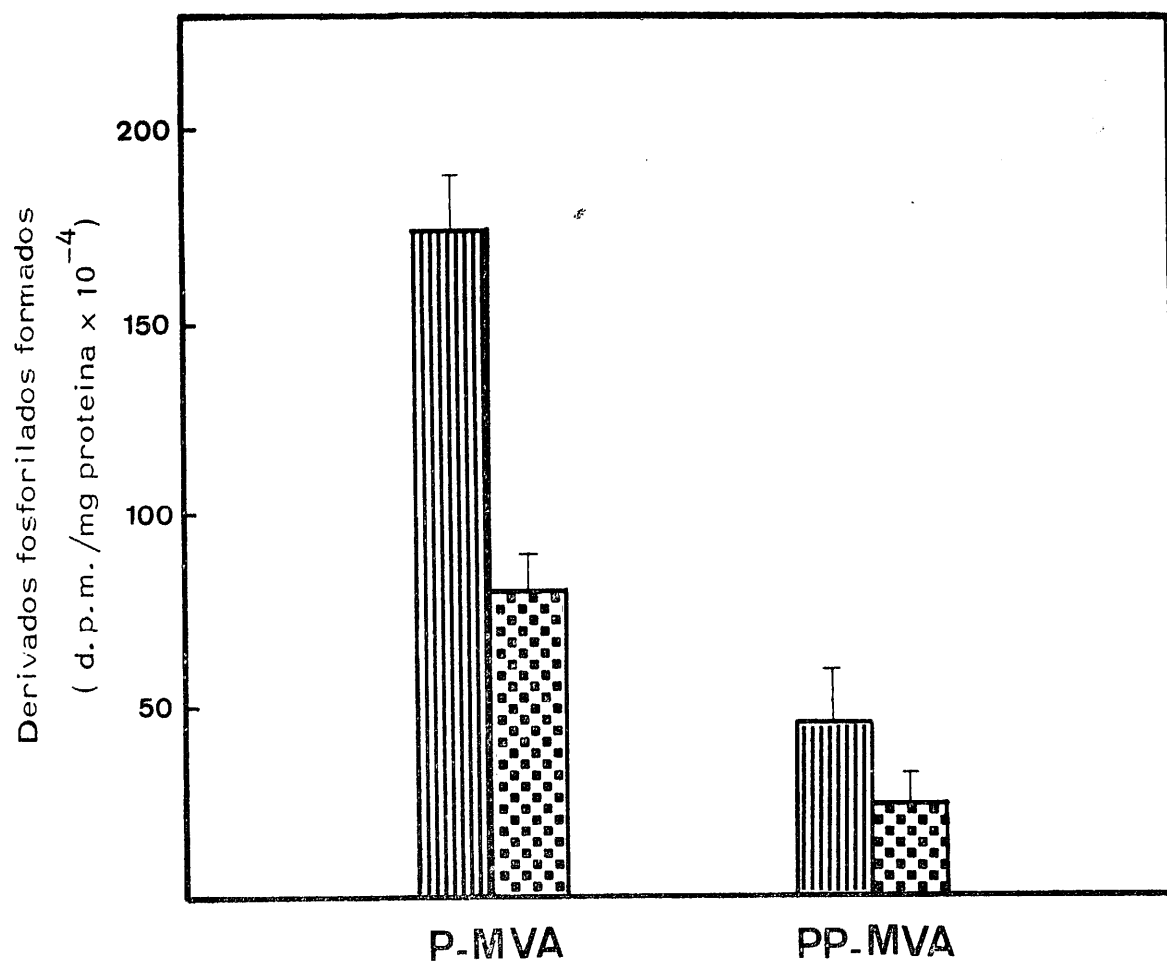
El carácter reversible de la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa y el hecho de estudiarse las dos reacciones de fosforilación conjuntamente podría significar el que una fuerte cantidad de ADP formado en la primera reacción de fosforilación desplazaría hacia la izquierda el equilibrio de la segunda, disminuyendo así la formación de

PP-MVA:



Uno de los primeros condicionantes para el estudio "in vitro" de las reacciones de fosforilación del MVA era establecer los límites de proporcionalidad entre la cantidad de producto o productos originados y la cantidad de proteína enzimática utilizada, y el tiempo de la reacción siempre que se mantuvieran constantes el sustrato y los efectores enzimáticos. La mayor actividad de las preparaciones de cerebro hace que la proporcionalidad se mantenga entre límites más estrechos, especialmente en cuanto a la cantidad de proteína enzimática adicionada, ya que solo existe la mencionada proporcionalidad hasta 0.2 mg de proteína, tanto para la formación de P-MVA como de PP-MVA, mientras que en riñón este límite es mucho mayor: 0.5 mg para el P-MVA y 1.5 mg para el PP-MVA. Asimismo es de destacar la mayor amplitud de los límites en que se mantiene la proporcionalidad para la formación de PP-MVA que de P-MVA, tanto en la cantidad de proteína enzimática usada como en el tiempo durante el cual se prolonga la reacción. Estos resultados especialmente patentes en el riñón, coinciden con los observados previamente en el hígado y podrían explicarse por la dependencia de la segunda reacción de fosforilación en cuanto a la formación de su sustrato, P-MVA, producto de la primera de las reacciones de fosforilación en estudio.

Figura nº 24



Diferencia en la cantidad de P-MVA y PP-MVA observados en extractos libres de células de cerebro (||||) y de riñón (■) de pollo de tres días de edad. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Contrariamente a lo observado en otros orígenes, la mevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo presenta un pH de actuación ligeramente ó francamente alcalino, ya que la máxima cantidad de fosfomevalónico se obtiene a pH 9.5 . Asimismo, aunque de una manera menos acusada, la cantidad de PP-MVA se incrementa a medida que lo hace el pH, dentro de los márgenes estudiados (5.5 - 9.5). Estos resultados difieren de los reseñados para ambas enzimas en otros animales, preferentemente mamíferos, en los que la mevalonato cinasa suele presentar la máxima actividad a pH 7-8, mientras que la fosfomevalonato cinasa se suele caracterizar por un amplio margen de pH en el cual presenta una actividad muy semejante.

En cuanto a la distribución intracelular, las enzimas estudiadas en cerebro y riñón de pollo son citoplasmáticas, aislandose fundamentalmente de la fracción sobrenadante de $105.000 \times g$. En este sentido, la localización de ambas enzimas coincide con la descrita en todos los orígenes animales (119) si bien en vegetales se ha observado también la existencia de isoenzimas de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa en el interior de los cloroplastos (158, 159, 160).

Como cosustrato de ambas reacciones se puede considerar al nucleótido, frente al cual los enzimas de cerebro y riñón de pollo presentan un requerimiento absoluto. Ello explica el hecho de que las reacciones llevadas a cabo sin suplementación de ningún nucleótido no originan cantidad alguna de P-MVA ni de PP-MVA. Entre los nucleótidos

ensayados el ATP es el más activo en ambos órganos, si bien el ITP también puede actuar como tal cosustrato aunque con mucha menor actividad. UTP y GTP son prácticamente inactivos. En este aspecto, las enzimas de cerebro y riñón de pollo coinciden con las de otros orígenes animales, si bien la de hígado de cerdo es casi igualmente activa con ITP que con ATP (114), y la de Sarcophaga bullata puede usar también ITP y UTP a pequeña concentración (120). Mientras que la mevalonato cinasa de hígado (163) resulta inhibida por altas concentraciones de ATP (10.0 mM), el riñón no parece afectarse por esta concentración, e incluso la de cerebro incrementa su actividad, si se compara con la obtenida a concentración 5.0 mM. Sin embargo, la cantidad de PP-MVA observado disminuye a medida que aumenta la concentración de nucleótidos, efecto que puede ser explicado por la acción del ADP tal como expresamos anteriormente.

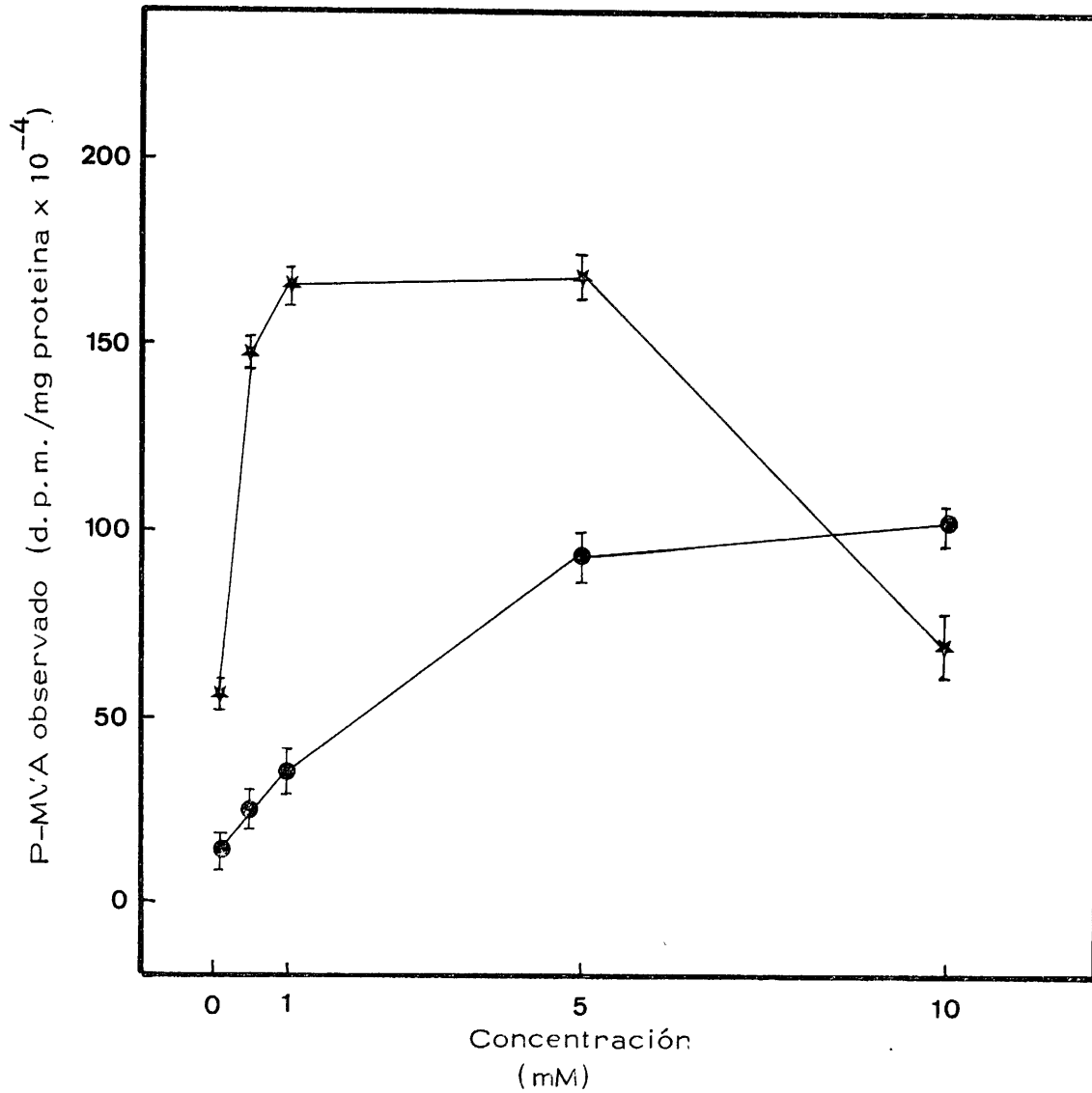
Tanto en el cerebro como en el riñón, la formación de P-MVA por extractos libres de células es mayor en presencia de Mn^{2+} que de Mg^{2+} a pequeñas concentraciones (0.1-1.0 mM). Este mejor funcionamiento del Mn^{2+} como ion activador de la mevalonato cinasa había sido descrito en otros orígenes, tanto animales como vegetales, (114, 135) y coincide asimismo con lo observado en el hígado de pollo (163). Ahora bien, mientras que el Mg^{2+} aumenta su actividad a medida que lo hace su concentración (10.0 mM), el Mn^{2+} ejerce una clara inhibición en ambos órganos, si bien a partir de diferente concentración, siendo muy clara la ejercida sobre la enzima de cerebro a partir de una concentración 1.0 mM, en cuyo aspecto recuerda a la enzima de hígado. Una inhibición

semejante por Mn^{2+} había sido encontrada en nuestro Departamento para la mevalonato cinasa parcialmente purificada de Agave americana (140) y también descrita en la enzima de hígado de cerdo (114) y latex de Hevea brasiliensis (130) (Figuras nº 25 y 26).

Otros iones ensayados como el Ca^{2+} ó el Zn^{2+} presentan solo una ligera capacidad fosforilante del MVA, mientras que, como era de esperar, los iones Hg^{2+} inhiben completamente a la mevalonato cinasa en los dos órganos estudiados.

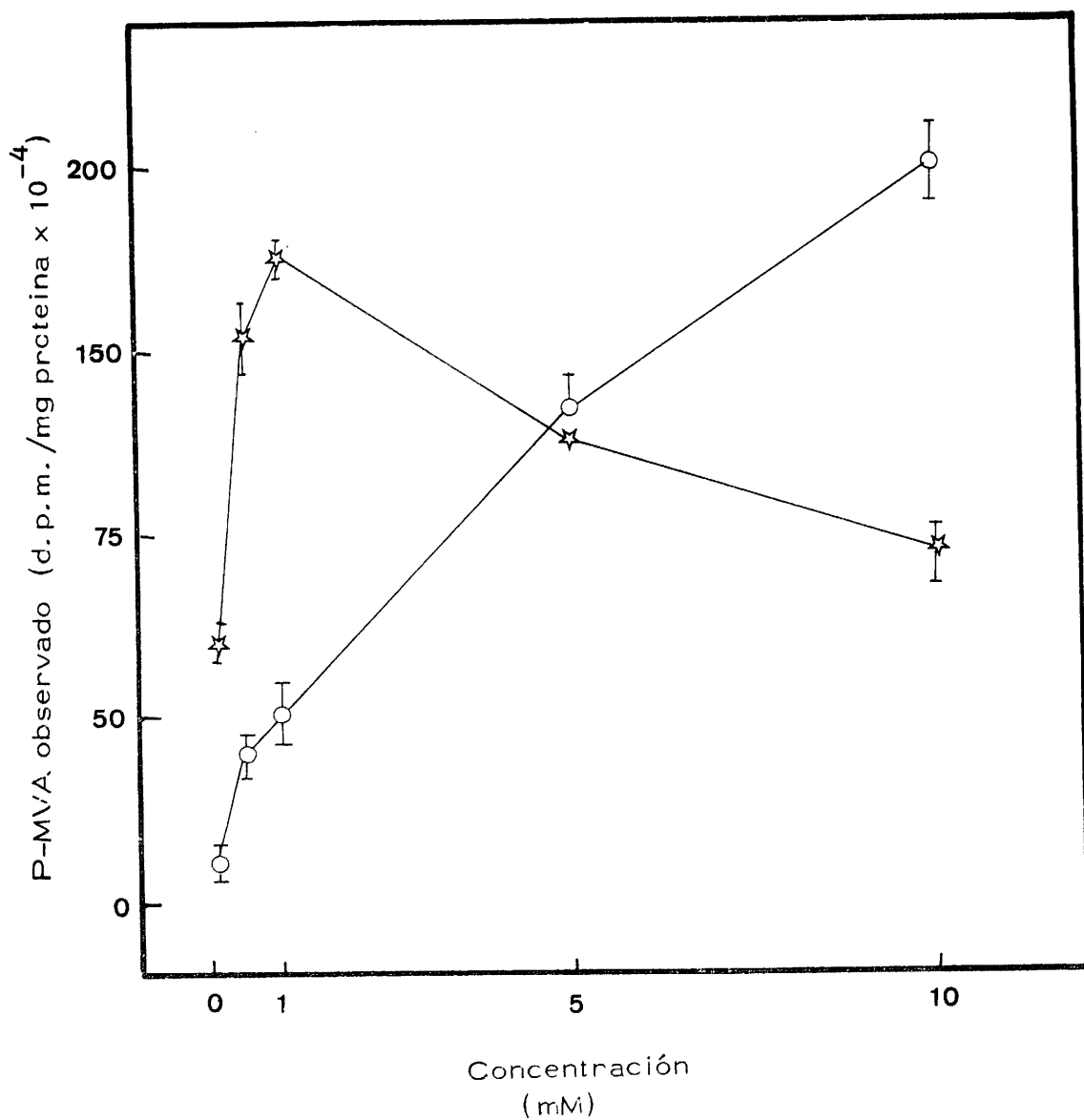
Esta inhibición ejercida por los iones Hg^{2+} parece estar en relación con la existencia de grupos $-SH$ en el centro activo de la enzima. En efecto, salvo la enzima de levadura (145) y de Hevea brasiliensis (130) que no precisan la suplementación de agentes protectores de grupos $-SH$ para la síntesis de compuestos isoprenoides a partir del MVA, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, todos los trabajos sobre este tema coinciden en señalar el efecto favorecedor de los agentes reductores y, en la mayoría de los casos su presencia resulta imprescindible. Todo ello es claro indicio de la presencia de algún grupo $-SH$ en el centro activo de la enzima. Sin embargo, las preparaciones enzimáticas de cerebro no requiere la adición de ningún agente protector de grupos $-SH$ para su actuación. Es más, la adición de DTT o de glutatión incluso disminuye la cantidad de P-MVA formado, cualquiera que sea la concentración a que se adiciona (0.1 - 10.0 mM). Otros protectores, como el βME , no afectan prácticamente a la actividad mevalonato cinasa.

Figura nº 25



Efecto inhibitor del Mn^{2+} (★) a altas concentraciones; y efecto activador del Mg^{2+} (●) sobre la formación de P-MVA por extractos libres de células de riñon de pollo. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 26



Efecto inhibitor del Mn^{2+} (☆) a altas concentraciones y efecto activador del Mg^{2+} (○) sobre la formación de P-MVA por tractos libres de células de cerebro de pollo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

En el caso del riñón, ninguno de los protectores a las concentraciones ensayadas parece afectar a la mevalonato cinasa. Tan solo la cisteína 10.0 mM inhibe claramente a la enzima, recordando en este aspecto a la misma enzima de hígado de pollo (163). Se trata pues, de un comportamiento distinto de la mevalonato cinasa de cerebro y de riñón, siendo solo esta última semejante a la de hígado, mientras que la de cerebro es mucho más sensible a los protectores de grupos -SH. Este efecto inhibitor no había sido descrito con anterioridad para enzimas fosforilantes del MVA.

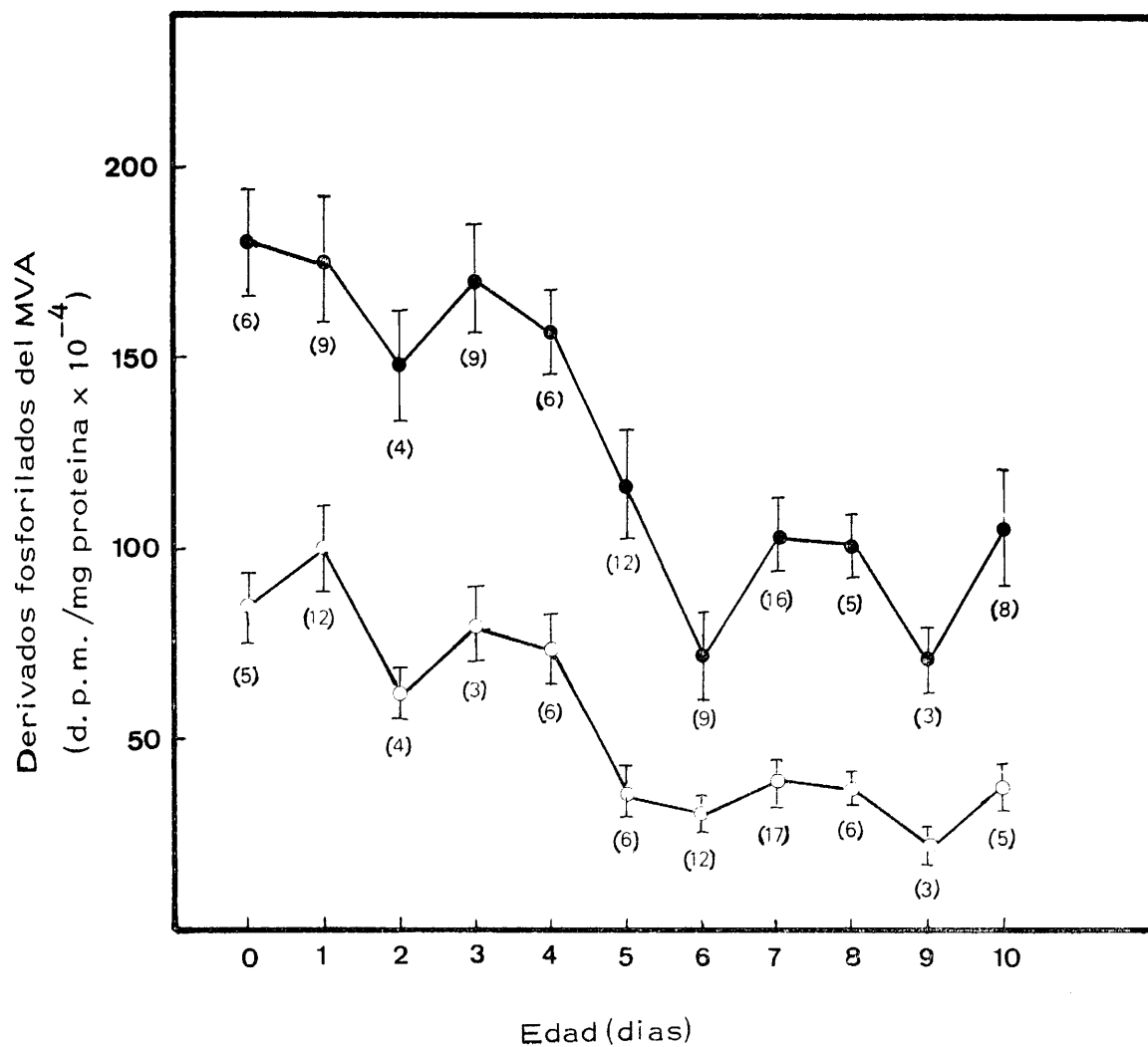
Sin embargo, la mevalonato cinasa tanto de cerebro como de riñón resultan fuertemente inhibidas por los agentes que bloquean los grupos -SH. Particularmente claro es el efecto del p-hidroximercuribenzoato que a una concentración 0.01 mM inhibe ya a la enzima de cerebro, mientras que la de riñón requiere concentraciones más elevadas (0.1 mM) para ser inhibida. El mismo efecto inhibitor presentaba el p-hidroximercuribenzoato sobre la enzima de hígado de pollo, de donde parece deducirse que en cualquiera de los órganos estudiados, la enzima tiene en su centro activo algún grupo-SH que es particularmente accesible a la acción del p-HMB. Otros agentes de este tipo prácticamente no le afectan, como es el caso de la N-etilmeleimida, mientras que otros como el DTNB solo ejerce inhibición a elevadas concentraciones (10.0 mM). Este comportamiento de la mevalonato cinasa de pollo no es esencialmente particular, por cuanto que la misma enzima presenta, según el origen de que proceda, un inhibidor más fuerte que otro.

Las variaciones exhibidas por la actuación de la mevalonato cinasa a lo largo del desarrollo postnatal son sumamente interesantes. En efecto, como veíamos al principio de esta Memoria, el pollo es un animal que nace prácticamente mielinizado por lo que la biosíntesis del colesterol en el cerebro debe ocurrir durante el periodo embrionario. Aún este constituyente de la mielina debe ser formado del saco vitelino. El hecho de que la actividad mevalonato cinasa de cerebro sea francamente elevada en el momento de la eclosión y vaya disminuyendo progresivamente a medida que el pollo va aumentando la edad parece sugerir que, al menos durante la última etapa del periodo embrionario, existe también una fuerte actividad enzimática, necesaria para la biosíntesis del colesterol en éste órgano, actividad que va decayendo a medida que el colesterol es menos necesario para el cerebro ya mielinizado (figura nº 27).

Algo semejante podría ocurrir con el riñón, en el cual la fosforilación del ácido mevalónico podría conducir bien a la síntesis de colesterol, o bien a la formación de cuerpos cetónicos, vía "shunt" del mevalonato, los cuales podrían ser utilizados posteriormente por el cerebro para la propia mielinización.

En este sentido es de destacar el comportamiento diferente exhibido por la mevalonato cinasa de hígado de pollo, la cual presenta un aumento significativo de su actividad entre los días 6-7 después de la eclosión (93), incremento que podría corresponder con la época en que aumenta la síntesis "de novo" del colesterol en este órgano.

Figura nº 27



Cantidad de P-MVA formado a lo largo del desarrollo postnatal de pollo por extractos libres de células de cerebro (●) y riñón de pollo (○). Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Un incremento paralelo parece sufrir la cantidad de colesterol libre ya que la proporción colesterol esterificado / colesterol libre disminuye con el tiempo, llegando a ser la cifra de colesterol libre algo superior a la del esterificado en pollo de diez días (161). Estos resultados coinciden con los de Deuel (162) quien afirma que en el pollo adulto la proporción de colesterol esterificado en el hígado es solo de un 7% del total. Todo ello hace suponer que el ester del colesterol cumple una función única en el embrión, bajando la proporción de ester cuando el pollo desarrolla sus propios mecanismos para la síntesis del colesterol. Queda aun por estudiar de una manera concreta las variaciones de las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa a lo largo del desarrollo embrionario, pero los resultados presentados en esta Memoria permiten sugerir que la mevalonato cinasa tiene un comportamiento paralelo al que sufre la síntesis del colesterol en los diferentes órganos de pollo a lo largo de su desarrollo postnatal. Este comportamiento característico, mucho más acusado que el de la fosfomevalonato cinasa hace pensar en una importancia fundamental de la primera de las enzimas de fosforilación del MVA en el metabolismo de este ácido "in vivo".

La última parte de esta Memoria contempla alguno de los posibles factores fisiológicos que pueden afectar a la fosforilación del MVA como son la influencia del colesterol suministrado con la dieta, la influencia del ayuno y la de un ritmo ciclico luz-oscuridad. Todos estos factores afectan a la biosíntesis del colesterol en la primera de sus grandes etapas, es decir entre el acetil-CoA y el MVA, estando descrito su efecto sobre la HMG-CoA reductasa. especialmente de hígado de rata (5). Re-

cientemente parece haberse establecido una cierta regulación por algunos de estos factores a nivel de la transformación MVA → Ip-PP en hígado de rata (16) por lo que nos pareció de interés estudiarlo en aves. Concretamente hemos utilizado pollos recién nacidos o de muy corta edad, que no podían estar acostumbrados a ninguno de los tratamientos necesarios o que a lo sumo lo estuvieron durante algunos días, por lo que los resultados obtenidos no pueden ser tomados como definitivos. En efecto, la alimentación con colesterol al 5% suplementado a la dieta desde el momento de la eclosión hasta los 10 días no parece influir sobre la fosforilación del MVA ni el cerebro ni el riñón. Sin embargo sería necesario un mayor periodo de tratamiento ó el utilizar pollos adultos para intentar establecer conclusiones definitivas en este aspecto. No obstante, también sería necesario llevar a cabo en hígado un estudio semejante al realizado en los otros dos órganos, con objeto de comparar los resultados y establecer en el hígado la existencia ó no de variaciones significativas.

Lo mismo podría decirse sobre las experiencias de ayuno y sobre la influencia del ritmo cíclico luz-oscuridad. En estos casos la necesidad de mayor tratamiento ó de mayor edad es aún más perentoria, ya que los pollos pequeños no son capaces de sobrevivir tras largos periodos de ayuno ni, por otra parte, han podido ser acostumbrados a un ritmo perfecto de luz-oscuridad. Las variaciones observadas en estas experiencias entran dentro de los límites normales de error por lo que no permiten establecer conclusiones definitivas.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This not only helps in tracking expenses but also ensures compliance with tax regulations. The second part of the document provides a detailed breakdown of the company's financial performance over the last quarter. It includes a comparison of actual results against budgeted figures, highlighting areas of both strength and weakness. The third part of the document outlines the company's strategic goals for the upcoming year, focusing on increasing revenue and reducing operational costs. It also discusses the various initiatives and projects that will be implemented to achieve these goals. The final part of the document provides a summary of the key findings and recommendations, along with a list of action items for management to consider.

The following table shows the company's financial performance over the last quarter. The table includes columns for the quarter, the budgeted amount, and the actual amount. The data shows that the company has exceeded its budget in several key areas, including revenue and profit. However, there are also areas where the company has fallen short of its budget, such as in the area of operating expenses. The table also includes a column for the variance between the budgeted and actual amounts, which is used to identify areas of both strength and weakness. The following table shows the company's strategic goals for the upcoming year. The table includes columns for the goal, the target amount, and the current status. The data shows that the company has set ambitious goals for increasing revenue and reducing operational costs. It also outlines the various initiatives and projects that will be implemented to achieve these goals. The following table provides a summary of the key findings and recommendations. The table includes columns for the finding, the recommendation, and the responsible party. The data shows that there are several areas where the company needs to improve, such as in the area of financial reporting and operational efficiency. The table also provides a list of action items for management to consider.

V. - CONCLUSIONES

V. - CONCLUSIONES

1º. - Se han demostrado las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico por preparaciones de cerebro y riñón de pollo recién nacido, estableciéndose las condiciones óptimas para su desarrollo "in vitro" como son la proporcionalidad: productos formados / proteína enzimática y productos formados / tiempo de incubación

2º. - Tanto la mevalonato cinasa de cerebro como la de riñón de pollo recién nacido aumentan su actividad a medida que lo hace el pH, dentro de los límites ensayados (5.5.-9.5), alcanzándose la máxima cantidad de P-MVA a pH 9.5. Un comportamiento semejante aunque menos acusado exhibe la fosfomevalonato cinasa.

3º. - Los dos enzimas que intervienen en la fosforilación del ácido mevalónico tienen una localización citoplasmática, aislandose preferentemente de la fracción sobrenadante de la centrifugación a 105.000 x g.

4º. - La fosfomevalonato cinasa resulta inhibida por 5 minutos de tratamiento a 50º C ó a 65º C. La mevalonato cinasa pierde su actividad por calentamiento a 65º C durante 5 minutos, pero la incrementa ligeramente cuando es mantenida de 5-10 min a 50º C resultando parcialmente inactivada con posterioridad.

5º. - Ambas enzimas fosforilantes del MVA presentan un requerimiento absoluto de nucleótidos, siendo el ATP el más activo, seguido por el ITP, en los dos órganos estudiados. El UTP y el GTP son prácticamente inactivos.

6º. - Los iones Mn^{2+} son más activos que los iones Mg^{2+} cuando se adiciona a pequeñas concentraciones (0.1 -1.0 mM). A concentración más elevada (5.0 -10.0 mM) el Mn^{2+} ejerce una clara inactivación de la mevalonato cinasa, mientras que el Mg^{2+} incrementa la actividad enzimática a medida que aumenta su concentración. La inhibición por Mn^{2+} es mucho más clara en el cerebro que en el riñón. Los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} son prácticamente inactivos, mientras que los iones Hg^{2+} inhiben completamente a la mevalonato cinasa.

7º. - La mevalonato cinasa y la fosfomevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo recién nacido no requieren la suplementación de protectores de grupos -SH. El DTT y el glutatión inhibe ligeramente a la mevalonato cinasa a concentración 0.1 -10.0 mM, mientras que el β -mercaptoetanol prácticamente no lo afecta.

8º. - La mevalonato cinasa es completamente inhibida por el p-hidroximercuribenzoato a partir de una concentración 0.01 mM, mientras que el DTNB solo inhibe completamente a concentración 10.0 mM. La N- etilmaleimida no tiene prácticamente ningún efecto.

9º. - La mevalonato cinasa presenta su máxima actividad en el cerebro en el momento de la eclosión, disminuyendo posteriormente a medida que aumenta la edad del pollo hasta el día 6 a partir del cual tiende a estabilizarse. Una variación semejante presenta la enzima del riñón.

10º. - La fosfomevalonato cinasa presenta solo muy ligeras variaciones en su actividad a lo largo de los primeros tres días de desarrollo, tendiendo a disminuir posteriormente.

11º. - La suplementación de colesterol al 5% a la dieta no parece influir sobre la actividad de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico en cerebro ni en riñón.

12º. - El ayuno de 24-48 h no afecta a las actividades enzimáticas en estudio.

13º. - El mantenimiento de los animales durante periodos alternos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad no parece afectar a las enzimas fosforilantes del MVA.

Conclusión general

La actividad específica de la mevalonato cinasa es superior en cerebro que en riñón de pollo y presenta variaciones

semejantes a lo largo del desarrollo postnatal, disminuyendo progresivamente desde el momento de la eclosión hasta el día 6, a partir del cual su actividad se mantiene dentro de unos límites semejantes.

Se han establecido las condiciones óptimas para el estudio de la fosforilación del MVA "in vitro", estudiando las propiedades de las enzimas implicadas: pH óptimo, requerimientos nucleotídicos y metálicos, influencia de protectores e inhibidores de grupos -SH, etc.

VI. - BIBLIOGRAFIA

VI. - BIBLIOGRAFIA

1. - BEYTIA, E. D. y PORTER, J. W. 1976. *An. Rev. Biochem.* 45, 113-142.
2. - WAGNER, A. F., FOLKERS, K. 1961. *Adv. Enzymol.* 23, 471-83.
3. - TAVORMINA, P. A., GIBBS, M. H. and HUFF, J. W. 1956, Utilization of β -hydroxy- β -methyl-valerolactone in cholesterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4498-99
4. - DECKER, K. and BARTH, Ch. 1973. Compartmentation of the early steps of cholesterol biosynthesis in Mammalian liver *Mol. and Cell. Biochem.* 2, 2, 179-88
5. - RODWELL, V. W., NORDSTROM, J. L., and MITSCHELEN, J. J. Regulation of HMG-CoA Reductase. *Adv. Lipid. Res.* 14, 1-74. (1976).
6. - RAMACHANDRAN, C. K. and SHAH S. N. 1977. Studies on Mevalonate kinase, Phosphomevalonate kinase and Pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain *J. Neurochem.* 28, 751-57
7. - JOHNSON, R. C. and SHAH, S. N. 1974. Microsomal Synthesis of Cholesterol from Squalene, Lanosterol and Desmosterol. *Ar. Biochem. and Biophys.* 164, 502-10
8. - KANDUTSCH, A. A. and SAUCIER, S. E. 1969. Prevention of Cyclic and triton induced increases and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. *J. Biol. Chem.* 244, 2299-2305.

9. - PACKIE, R.M. and KANDUTSCH, A.A. 1973. Rates of sterol synthesis and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase levels and the effect of cholest-4-en-3 one on these parameters in the livers of inbred-strains of mice. *Biochem. Genet.* 4, 203-214.
10. - GANS, J.H., BLOCK, A. J. and CARTER, M. R. 1973. "In vivo" incorporation of ^{14}C into liver and kidney sterol from parenterally administered (2- ^{14}C) D. L-mevalonic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 609-612.
11. - SLAKEY, L.L., NESS, G.C., QURESHI, N. and PORTER, J. W. 1973. Occurrence of the enzymes affecting the conversion of acetyl CoA to squalene in homogenates of hog aorta. *J. Lipid Res.* 14, 485-494.
12. - BELL, F.P. 1976. Biosynthesis of various sterol. Sterols esters and squalene from (^{14}C) mevalonate by normal swine intima and media "in vitro". A comparative study *Exp. Mol. Pathol.* 25, 279-292.
13. - EDGREN, B and HELLSTROM, K. 1972. Lipid biosynthesis from DL (2- ^{14}C) mevalonic acid in intact mice and rabbits. *Acta Physiol. Scand.* 86, 250-256.
14. - BACK P., HAMPRECHT B., and LYNEN F. 1969. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21.
15. - HICKMAN P. E., NORTON B. J. and SABINE J. R. 1972. Effect of adrenalectomy on the diurnal variation of hepatic cholesterolgenesis in the rat. *J. Lipid Res.* 13, 17-22.

16. - BHAT, C. S. and RAMASARMA, T. 1977. Rhythmic activity of utilization of mevalonate for biogenesis of cholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-88
17. - SHAH, S.N. 1973. Regulation of hepatic cholesterol synthesis from mevalonate in suckling and weaned rats. *Lipids.* 8, 284-288
18. - JOHNSON , R.C. and SHAH, S.N. 1977. Hepatic cholesterol synthesis from mevalonate and squalene in rats: Effect of feeding cholesterol supplemented diet during weaning and following starvation . *Lipids.* 9, 962-970
19. - GOULD, R.G. and SWRYD, E.A. 1966. Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *J. Lipid. Res.* 7, 698-707
20. - SHAPIRO, D.J. and RODWELL, V.W. 1971. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis, *J. Biol. Chem.* 246, 3210-3216.
21. - SLAKEY, L.L., CRAIG, M.C., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESHI, A.A., SUBBARAYAN, C. y PORTER, J. W. 1972. The effects of fasting, refeeding and time of day on the levels of enzymes effecting the conversi3n of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A to squalene. *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022.
22. - RAO, G.S. and RAMASARMA, T. 1972. ATP in the regulation of cholesterol biosynthesis. A supra-energetic role. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 225-229.
23. - RAICHT, R.F., COHEN, I.B., SHEEFER, S. and MOSBACH, E.H. 1975. Sterol balances studies on the rat. Effects of dietary cholesterol and B-sitosterol balance and rat-limiting enzymes of sterol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 388. 374-384.

24. - WISS, O. 1976 . Influence of a lipogenic diet on the cholesterol synthesis in rats "in vivo" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 350-352.
25. - WISS, O. 1976. Influence of fasting and cholesterol feeding on the cholesterol synthesis in rats "in vivo". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 353-357.
26. - RODRIGUES, M. P. y LEAL, R. S. 1970. Hepatic mevalonate metabolism in the presence of fluoride ion *C.R. Soc. Biol.* 164, 2701.
27. - HORNBY, G.M. ONAJOBI, F.D. and BOYD, G. S. 1970. The effects of thiols on cholesterol synthesis by rat liver "in vitro" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 524-529.
28. - KURODA, M. and ENDO, A. 1977. Inhibition of "In vitro" cholesterol synthesis by fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 468, 70-81.
29. - MITROPOULUS, K. A., GIBBONS, G. F., CONNELL, C.M. and WOODS, R.A. 1976. Effects of triarimol on cholesterol biosynthesis in rat-liver subcellular fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 892-900.
30. - DURR, I. F. 1968, Factors affecting the metabolism of mevalonate by adipose tissue comp. *Biochem. Physiol.* 25, 663-671.
31. - DURR, I. F. and MURAD, M. 1971. Comparative metabolism of mevalonate in intestinal-mucosa of rat, cat and dog. *Int. J. Biochem.* 2, 249-252.
32. - RITTEMBERG, D., SCHOENHEIMER, R. 1937. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism . XI Further Studies on the biological uptake of deuterium into organic substances , with special reference to fat and cholesterol formation. *J. Biol. Chem.* 121, 235-253. ,

33. -BLOCH, K., BERG, B.N. RITTEMBERG, D., 1943. - The biological conversion of cholesterol to cholic acid J. Biol. Chem. 149, 511-517
34. - CHEVALIER F. 1956. Origine des stérols fécaux .II .Détermination des quantités des stérols excrétés et secretés et de la fraction du cholestérol des parois digestives renouvelés par transfert. Bull. Soc. Chim. Biol. 42. 633-641.
35. - BLOCH, K.; BOREK, E., RITTENBERG, D, 1946. - Synthesis of cholesterol in surviving liver. J. Biol. Chem. 162, 441-449
36. - SZERE, P.A., CHAIKOFF, I. L. TREITMAN, S.S. BURSTEIN, L. S. 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol . J. Biol. Chem. 182, 629-634.
37. - GOULD, R. G. , COOK, R.P. 1958, The metabolism of cholesterol and other sterols in the animal organism. In "Cholesterol" ed. Cook. R.P. , Academ. Press New York, 237-307
38. - KRITCHEVSKY, D (ed.) 1958. Cholesterol, John Wiley Sons, New York.
39. - GOULD, R. G. , TAYLOR, C.B. 1950. - Effect of dietary cholesterol on hepatic cholesterol synthesis. Fed. Proc. 9, 179.
40. - SIPERSTEIN, M.D. FAGAN, V.M. 1964. - In: Advances in Enzyme regulation Vol II. edited by Werber G. Pergamon Pres, Oxford, 249-264.
41. - BELL, G.H. DAVIDSON, J.N. SCARBOROUGH, H. (Edit.) 1963. - Physiology and biochemistry and S. Livingstone, Edinburgh and London

42. - GANONG, W.F. (editor) 1965. Medical Physiology, Blackwell scientific Publications, Oxford.
43. - CHEVALLIER, F., 1956 L'espace cholesterol du rat. Arch. Sci. Physiol. 10, 249-275.
44. - CHEVALLIER, F., 1956. - Synthèse du cholestérol chez le rat. Résultats obtenus a l'aide de L'acetate-1-¹⁴C. Arch. Sci. Physiol. 10. 321-336.
45. - CHEVALLIER, 1967. Dynamics of cholesterol in rats, studied by the isotopic equilibrium method. Advances in Lipid Research Vol V. edited by R. Paoletti, D. Kritchevsky, Academic Press, New York, 209-230.
46. - HAGER MANN, J. S. GOULD, R.G. 1951. The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red cells Proc. Soc. Exp Biol (N. Y.) 78, 329-332.
47. - D'HOLLANDER F, CHEVALLIER F. 1972. - Movement of cholesterol in vitro in rat blood and quantitation of the exchange of free cholesterol between plasma and erythrocytes J. Lipid. Res. 13, 733 -744.
48. - CHEVALLIER, F., LUTTON, C. 1966. - Vitesses des processus de renouvellement du cholesterol contenu dans son espace de transfert chez le rat. I. Methodes et resultats obtenus dans le cas d'un régime semisynthétique témoin. Bull. Soc. Chim. Biol (Paris, 48, 507-523.
49. - LUTTON C. CHEVALLIER F. 1972. - Vitesses des procesus de renouvellement du cholesterol contenu dans son espace de transfert chez la rat. III. Modifications et étude critique de la méthode d'équilibre isotopique. Biochem. Biophys. Acta (Amst) 255, 762-777.
50. - CHEVALLIER F. and MATHE D. Cholesterol biosynthesis interest of comparing "in vivo" and "in vitro" findings. Path. Biol. 24, 6, 377-381.

50. - CHEVALLIER F. and MATHE D. Cholesterol biosynthesis interest of comparing "in vivo" and "in vitro" findings. *Path.Biol.* 24, 6, 377-381.
51. - CHEVALLIER, F. Lutton C. 1973, - The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol.* 242, 61-62.
52. - LUTTON C. , CHEVALLIER F. 1976. - Coefficient d'absorption du cholesterol alimentaire paramètre fondamental de l'équilibre dynamique du cholesterol chez le rat *Biomédecine*
53. - CHEVALLIER F. MAGOT T. 1975. - Evidence of major role of the intestine in cholesterol synthesis in the adult mole rat. *Experientia. (Basel)* 31. 627-629.
54. - GIBSON, W. R. and NALBANDOV, A. V. 1966 Lipolysis and lipogenesis in liver and adipose tissue of hypophysectomised cockerels. *Am. J. Physiol.* 211 1352-1356.
55. - LEVEILLE, G.A. , O'HEA E.K. and CHAKRABARTY. 1968 In vivo Lipogenesis in the domestic fowl. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 398-401.
56. - LEVEILLE, G.A. 1966 Glycogen metabolism in meal fed rats and chicks and the time sequence of lipogenic and enzymatic adaptative changes. *J. Nutr.* 90. 449-460.
57. - GOODRIDGE, A. G. 1968 a. Conversion of (U-¹⁴C) glucose into carbon dioxide. glycogen cholesterol and fatty acids in liver slices from embryonic and growing chicks. *Biochem. J.* 108, 655-661.

58. - O'HEA, E.R. and LEVEILLE, G.A. 1969 b Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick. (*Gallus domesticus*)
Comp. Biochem. Physiol. 30. 149-159.
59. - GOODRIDGE, A.G. and BALL E. G. 1966 Lipogenesis in the pigeon in vitro studies Am. J. Physiol. 211., 803-808.
60. - GOODRIDGE A. and BALL E.G. 1967 Lipogenesis in the pigeon in vivo Studies. Am. J. Physiol. 213, 245-249.
61. - EVANS, A. J. 1972. In vitro lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbuzy duck at different ages
Br. Pult Sci. 13, 595-602.
62. - SCHOENHEIMER R. RITTEMBERG D, 1930 Deuterium as an indicator in the Study of intermediary metabolism. VII Synthesis and destruction of fatty acids in the organism J. Biol. Chem. 114. 381-396.
63. - KILSHEIMER, G. S. WEBER, D. R. and ASHMORE J. 1960 Hepatic glucose production in developing chicken embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 515-518.
64. - FAVARGER, P. 1965. In: Hand-book of Physiology Section 5-: Adipose tissue, edited by A.E. RENOLD and G.F. CAHILL, Jr. Washington, D. C. Am. Physiol. Soc. 19
65. - LEVEILLE, G.A. 1967 b. In vivo fatty acid and cholesterol synthesis in fasted and fasted-refed chicks. J. Nutr. 98, 367-372.
66. - GALTON, D. J. 1968 Lipogenesis in human adipose tissue. J. Lipid Res. 9, 19-26.

67. -SHRAGO, E. SOLENON, J. A. and GORDON, E. S. 1971 Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism* 20. 54-62.
68. - SHRAGO, E. SPENNETTA T. and GORDON E. 1969 Fatty acid synthesis in humane adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 244 2761-2766.
69. - LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
70. - LEVEILLE; G. A., ROMSOS, D.R., YEH, Y.Y. and O'HEA, E. K. 1975 Lipid biosynthesis in the chick . A consideration of site of synthesis. Influence of diet and Possible Regulatory mechanisms. *Poultry Sc.* 54. 1075-1093.
71. - TEEKEL, R. A., BREIDENSTEIN, C. P. and WATTS, A. B. 1975 Cholesterol metabolism in the chicken. *Poultry Sci.* 54 1036-1042 .
72. - SHABALINA, A. 1975. Genetic studies on cholesterol in the chicken *C. R. Acad. Agric. G. Dimitov.* 8, 109-113.
73. - HO, K .J. 1976. Cholesterol contents of various tissues of chickens with exogenous or endogenous hypercholesterolemia. *Amer. J. Clin. Nutrition* 29, 187-191.
74. - CHVAPIL, M., STITH, P. L. TILLEMA, L. M. CARLSON, E.C., CAMPBELL, J. B. and ESKELSON, C. D. 1976. Early changes in the arterial wall of chickens fed a cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 24, 393-405.

75. - WORCESTER, N. A. , BRUCKDORFER, K. R. and YUDKIN, J. 1975
Effect of dietary sucrose and dietary cholesterol on hyperlipidaemia and atherosclerosis in white Leghorn cockerels (Gallus domesticus) Proc. Nutr. Soc. 34, 81A.
76. - WORCESTER, N. A. BRUCKDORFER, K. R. and YUDKIN, J. 1975
The effect of dietary sucrose and different dietary fats on hyperlipidaemia and atherosclerosis in White Leghorn cokerels (Gallus domesticus) Proc. Nutr. Soc. 34. 82A.
77. - SKLAN, D. , BUDOWSKI, P. and HURWITZ, S. 1974. Effect of soy sterols on intestinal absorption and secretion of cholesterol and bile acids in the chick. J. Nutr. 104, 1086-1090.
78. - GODFREY, J. C. , LUTTINGER, J. R. TAYLOR, H. D. and SANHYEZA G. M. 1976: Dietary plant sterol-induced reduction of egg yolk cholesterol in the chicken. Nutr. Rep. Int. 13, 263-271.
79. - HWANG, E.C. , GRIMMINGER, P. and FISHER, H. 1975. Effect of anti-hypercholesterolemic substances (AHS) on liver vitamin A activity in normo- and hypercholesterolemic chickens. Nutr. Rep. Int. 11. 185-191.
80. - HWANG, E.C. , GRIMMINGER, P. and FISHER, H. 1975. Effect of varying levels of cholestyramine and Sephadex on liver vitamin A concentration of chickens fed three levels of cholesterol. Nutr. Rep. Int. 11, 193-198.
81. - WOODS, J. E. and PODCZASKI, E. S. 1974. Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol 24, 413-423.

82. - KALLIECHARAN, R. and HALL, B. K. 1974 A developmental study of the levels of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone circulating in plasma of chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 24. 364-372
83. - KALLIECHARA, N. R. and HALL, B.K. 1976. A developmental study of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone in the adrenal glands of the embryonic chick. Gen. Comp. Endocrinol. 30. 404-409
84. - IDLER, D. R., WALSH, M. J. KALLECHARAN, R. and HALL, B. K. 1976 Identification of cortisol in plasma of the embryonic chick. Gen. Comp. Endocrinol. 30. 539-540
85. - BOUCEK, R. J. and SAVARD, K. 1970. Steroid formation by the avian ovary "in vitro", Gen. Comp. Endocrinol. 15. 6-11
86. - GALLI, F.E., IRUSTA, O. and WASSERMAN, G. F. 1975. Metabolism of steroids by left ovaries of Gallus domesticus during post embryonic maturation. Acta Phys. Lat. Amer. 25, 60-66
87. - NAKAMURA, T., TANABE, y and KATUKAWA, I. 1974. Steroidogenesis "in vitro" by the ovarian tissue of the domestic fowl. J. Endocrinol. 63. 507-516
88. - CLINKENBEARD, K. D. REED, W. D., MOONEY, R. A. and LANE, M. D. 1975. Intracellular localization of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A generating system for cholesterologenesis and ketogenesis. J. Biol. Chem. 250, 3108-3116

89. - CLINKENBEARD, K. D., SUGIYAMA, T., REED, W. D. and LANE M. D. 1975. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from liver. Purification, properties and role in cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 250, 3124-3135.
90. - REED, W. D., CLINKENBEARD, K. D. and LANE, M. D. 1975. Molecular and catalytic properties of mitochondrial (Ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver *J. Biol. Chem.* 250, 3117-3123.
91. - BEG, Z.H., STONIK, J. A. and BREWER, Jr. H. B. 1977. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from chicken liver *FEBS Lett* 80, 123-129
92. - KING, Jr., H. L. and RILLING, H. C. 1977. Avian liver phenyltransferase. The role of metal in substrate binding and the orientation of substrates during catalysis. *Biochem.* 16, 3815-3819.
93. - GARCIA-MARTINEZ J., SEGOVIA J.L., SUAREZ M.D., and GARCIA PEREGRIN E. 1976. Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 72, 1, 202-208.
94. - HELLSTROM K., SIPERSTEIN M., BRICKER L. y LUBY L. 1973. "In vivo" metabolism of mevalonic acid in the normal rat. *J. Clin. Invest.* 52, 1303-1313.
95. - RASKIN pH. and SIPERSTEIN m. D. 1974. Mevalonate metabolism by renal tissue in vitro. *J. Lipid Res.* 15. 20-25.

96. - EDMOND, J. and POPJAK, G. 1974. Transfer of carbon Atoms from Mevalonate to n-fatty Acids J. Biolog. Chem. 249, 1, 66-71
97. - FOGELMAN, A. M., EDMOND, J. and POPJAK, G. 1975. Metabolism of mevalonate in rats and man not leading to sterols. J. Biol. Chem. 250, 1771-1775
98. - RIGHETTI, M., WILLEY, M. H. MURRILL, P. A. and SIPERSTEIN, M. D. 1976. The "in vivo" metabolism of mevalonate by sterol and non sterol pathways. J. Biol. Chem. 251, 2716-2721
99. - EDMOND, J., FOGELMAN, A. M. y POPJAK, G. 1976. Mevalonate metabolism: Role of kidneys. Science 193, 154-156
100. - JOHNSON, B. L., EDMOND, J. FOGELMAN, A. M. and POPJAK, G. 1976, Mevalonate metabolism: Effect of $K_2Cr_2O_7$ a renal tubular toxin Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1264-1269
101. - WILEY M. H., HOWTON M. M., SIPERSTEIN M. D. 1977. The quantitative role of the kidneys in the "in vivo" metabolism of mevalonate. J. Biol. Chem. 252, 548-554.
102. - CUZNER, M. L. DAVISON, A. N. GREGSON, N. A. 1965. Chemical and Metabolic studies of rat myelin in the central nervous system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 122, 86-89
103. - O'BRIEN J. S. 1967 Cell Membranes composition structure function . J. theoret. Biol. 15, 307-311

104. - CHEVALIER, F. and GAUTHERSON, C. 1969. A methods for the study of cholesterol biosynthesis in the central nervous system. Incorporation of 2-¹⁴C mevalonic lactone after intraperitoneal, intracisternal and intraventricular administration in the rat J. Neurochem. 16. 323-331
105. - RAMSEY, R. B., JONES, J. P. NAQVI, S. H. M. and NICHOLAS H. J. 1971 The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue. I. Subcellular biosynthesis "in vitro" Lipids. 6, 154-161
106. - RAMSEY, R. B., JONES, J. P., NAQVI, S. H. M. and NICHOLAS H. J. 1971 Biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue : II. Comparison of "in vitro" and "in vivo" methods. Lipids. 6, 225-232
107. - EDMOND, J. 1974, Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. J. Biol. Chem. 249, 72-80
108. - TCHEN T. T. 1958. Mevalonic kinase: purification and properties. J. Biol. Chem. 233, 1100-1103.
109. - LEVY, H. R. y POPJAK, G. 1959. Mevalonic liver kinase. Biochem. J. 72, 35 P
110. - COOPER, C. Z. and BENEDICT; C. R. 1967, Mevalonic acid kinase in Euglena gracilis. Plant. Physiol. 42, 515-519
111. - CORNFORTH, R. H., CORNFORTH, J. W. and POPJAK, G. 1962. Preparation of (R)-and (S) mevalonalactones. Tetrahedron 18, 1351-1354

112. - CORNFORTH, R. H. , FLETCHER, K. , HELLIG, H. and POPJAK G. 1960. Sterospecificity of enzymic reactions involving mevalonic acid . Nature 185, 923-924.
113. - MARKLEY K. and SMALLMAN, E. 1961 Mevalonic kinase in rabbit liver Biochim. Biophys. Acta. 47, 327-335
114. - LEVY, H. R. and POPJAK, G. 1960. Biosynthesis of cholesterol. X. Mevalonic kinasa and phosphomevalonic kinase from liver. Biochem. J. 75, 417-428.
115. - DORSEY, J. K. and PORTER, J. W. 1968. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. J. Biol. Chem. 243, 4667-4670
116. - BENEDICT, C. R. , KETT, J. and PORTER, J. W. 1965. Properties of farnesyl pyrophosphate synthetase of pig liver Arch. Biochem. Biophys. 110, 611-621
117. - HOLLOWAY, P. W. and POPJAK, G. 1967. The purification of 3-3-Dimethyl-ally-a and geranyl transferase and og isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver, Biochem. J. 104, 57-25 p
118. - FLINT, A. P. F. 1970. The activity and kinetic properties of mevalonate kinase in superovulated rat ovary. Biochem. J. 120, 145-150
119. - BEYTIA E. , DORSEY J. K. , CLELAND W. W. , and PORTER J. W. 1970. Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase. J. Biol. Chem. 245. 5450-5458.
120. - GOODFELLOW, R. D. and BARNES, F. J. 1971, Mevalonate kinase from the larva of the fleshfly, Sarcophaga bullata Insect. Biochem. 1, 271- 282

121. - BARNES, F. J. and GOODFELLOW, R. D. 1971. Mevalonate kinase localization and variation in activity during development of Sarcophaga bullata. J. Insect Physiol. 17, 1415-1427
122. - GOODFELLOW; R. D., BARNES; F. J. and GRAHAM= W. J. 1971. Dietary sterol effects of mevalonate kinase activity in axenic and non -axenic Sarpophaga bullata. J. Insect Physiol. 17, 1625-1635
123. - OHNOKI, S., SUXUE, G. and TANAKA, S. 1962. 5-Phosphomevalonic acid as the intermediate of the enzymatic synthesis of bacterial phytoene. J. Biochem. 52, 423-427
124. - GREEN T. R. and BAISTED, D. J. 1970. A mevalonate kinasa assay. Anl. Biochem. 38, 130-138
125. - PORTER J. W. and GUCHHEIT R. B. 1966. A gas liquid chromatographic method of assay for mevalonic acid. Anal. Biochem. 15, 509-516.
126. - BLOCH, K., RASSON, E. y PORTER, J. W. 1968 Separation of water soluble steroid and carotenoid precursors by DEAE-Cellulose colum, chromatography . Anal. Biochem. 22, 249-259
127. - DUGAN, R. E. CHAYKIN, S., PHILIPS, A. H. y de WAARD, A. 1959 Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. J. Biol. Chem. 234, 2595-2604
128. - TCHEN, T:T. 1962. Methods in Enzymology. Colowicks S. P, and Kaplan, N. O. Vol. 5, 489-499. Academic Press, New York
129. - GREEN, T. R. y BAISTED, D. J. 1972, Development of the activities of the enzymes of the isoprenoid pathway during early stages of pea-seeds germination. Biochem. J. 130, 995

130. - WILLIAMSON, I. P. y KERWICK, R. G. O. 1965. The formation of 5-phosphomevalonate by mevalonate kinase in Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 96, 862-871
131. - CHESTERTON, C. J. y KERWICK, R. G. O. 1966. Formation of ³-isopentenyl phosphate by Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 98, 26 P.
132. - VELENZUELA, P., BEYTIA, E. CORI, O. Y YUDELEVICH, A. 1966. Phosphorylated intermediates of terpene biosynthesis in Pinus radiata. *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 536-539
133. - VALENZUELA, P., CORI, O and YUDELEVICH, A. 1966. Occurrence of monoterpenes in Pinus radiata and utilization of labeled CO₂ and mevalonic acid. *Phytochem.* 5, 1005-1011
134. - BEYTIA, E., VALENZUELA, P. y CORI, O. 1969. Terpene biosynthesis: formation of nerol, geraniol and other prenyls by an enzyme system from Pinus radiata seedling. *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 346-359
135. - GARCIA-PEREGRIN, E. 1970. Incorporación de ácido mevalónico (MVA-1-¹⁴C y MVA-2-¹⁴C) por plantas Pinus pinaster. *Ars. Pharm.* XI 15-33
136. - GARCIA PEREGRIN, E. y MAYOR, F. 1969. Influence of some-SH group effectors on the incorporation of mevalonic acid by Pinus pinaster seedlings. *Rev. Esp. Fisiol.* 26, 209-216
137. - SUAREZ, M. D. GARCIA PEREGRIN, E. y MAYOR F. 1974. Mevalonate kinase from Pinus pinaster seedlings. *Phytochem.* 13, 1059-1063

138. - GARCIA PEREGRIN, E. SUAREZ, M. D. y MAYOR F. 1973. Isolation of two fractions with mevalonate kinase activity from Pinus pinaster and Agave americana. FEBS Letters 30, 15-17
139. - GARCIA PEREGRIN, E. SUAREZ, M. D. ARAGON, M. C y MAYOR F. 1972. Mevalonate phosphorylation in Agave americana. Phytochem. 11, 2495-2498
140. - SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN, E. 1977 Properties and partial purification of mevalonate kinase from Agave americana Phytochem. 16, 661-665
141. - OSHIMA-OBA K and URITANI I. 1969. Phytopathological chemistry of sweet potato with black rot and injury LXXVIII. Enzymatic synthesis of isopentenyl pyrophosphate in sweet potato root tissue in response to infection by black rot fungus. Plant. Cell. Physiol. 10, 827-843.
142. - POTT, V. H. y BRUEMMER, J. H. 1970. Mevalonate-activating enzymes in the orange. Phytochem. 9, 99-105
143. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1972. The inhibition of plant mevalonate kinase preparations by prenyl pyrophosphates. Biochim. Biophys. Acta. 279, 290-296
144. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1969. Mevalonate kinase from etiolated cotyledon of French beans. Biochem. J. 113, 37 P
145. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1973. An assessment of some molecular parameters of mevalonate kinase from plant and animal sources. Arch. Biochem. Biophys. 150, 458-462

146. - THOMAS, D. R. y STOBART, A.K. 1970. Mevalonate activating enzyme in greening tissue cultures. *Phytochem.* 9, 1443-1451
147. - HILL, H. W. y ROGERS, L. J. 1974. Mevalonate activating enzymes and phosphates in higher plants. *Phytochem.* 13, 763-777
148. - DOWNING M.R. and MITCHELL E.D. 1974. Metabolism of mevalonic acid to phosphorylated intermediates in a cell-free extract from Nepeta cataria . *Phytochem.* 14, 369-371.
149. - DOWNING, M. R. y MITCHELL, E. D. 1975. Mevalonate activating enzymes in callus culture cells from Nepeta cataria. *Phytochem.* 14, 369-371
150. - LINARES, A. SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN, E. 1977, Metabolism of mevalonic acid to phosphorylated derivatives in chlorella. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 974-980
151. - HENNING, V., MOSLEIN, L. M. y LYNEN F. 1959. Biosynthesis of terpenes V. Formation of 5-pyrophosphomevalonic acid by phosphomevalonic kinase. *Arch. Biochem.* 83, 259-267.
152. - NORDIIE, R. y LARDY, H. 1962. - The enzymes Boyer, P. D. Lardy, H. y Myrback, K. Vol. 6, 3-46. Academic Press. London
153. - HELLING, H. y POPJAK, G. 1961. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XIII. Phosphomevalonic kinase from liver *J. Lipid. Res.* 2, 235-243.
154. - SKILLETER, D. N., WILLIAMSON, I. P. y KEKWICK, P. G. O. 1966. Phosphomevalonate kinase from Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 98, 27 P.

155. - SKILLETER D.N. y KEKWICK R.G.O. 1971. Enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate-5-phosphate) in the latex of Hevea brasiliensis. *Biochem. J.* 124, 407-417.
156. - RUZICKA L. 1953. The isoprene rule and the biogénesis of terpenic compounds. *Experientia.* 9, 357-367.
157. - ARAGON M.C. 1971. Estudio radiocromático de la incorporación del ácido mevalónico (1-¹⁴C y 2-¹⁴C) por extractos de Agave americana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Granada.
158. - ROGERS L, SHAH S.P.J. and GOODWIN T.W. 1965. Intracellular localization of mevalonic kinase in germination seedlings, its importance in the regulation of terpenoid biosynthesis. *Phytochem.* 13, 1419-1421.
159. - ROGERS L.J., SHAH S.P.J. y GOODWIN T.W. 1966. Intracellular localization of Mevalonate-Activating Enzymes in plant cells. *Biochem. J.* 99, 381-388.
160. - LOOMIS W.D. and BATAILLE J. 1963. Biosynthesis of terpenes. III. Mevalonic acid kinase from higher plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 67, 54-63.
161. - GOMEZ-CAPILLA J.A., MACARULLA J.M., MARITIN A., y OSORIO C. 1975. Evolución de los lípidos hepáticos durante el período embrionario y postnatal del Gallus domesticus. *Rev. Esp. Fisiol.* 31, 177-182.
162. - DEUEL J.J. 1955. "The Lipids" Interscience Pub. Co. New York.
163. - GARCIA MARTINEZ J. 1978. Characterization of mevalonate activating enzymes in the neonatal chick liver. *Camp. Biochem. Physiol.* (en prensa).



C

~~1978~~

t 3/59

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

CONTRIBUCION DEL CEREBRO Y DEL RIÑON AL METABOLISMO DEL ACIDO
MEVALONICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL POLLO

ANA LINARES GIL
Tesis doctoral

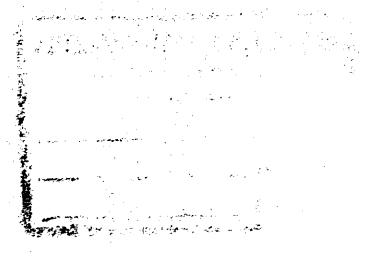
UNIVERSIDAD DE GRANADA
C15420477
613451807

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
— GRANADA —
C
109
31

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1978

CONTRIBUCIONES DEL CEMENTO Y DEL PÓVEDO AL REFRIGERANTE
MÉTODOS DURANTE EL DESARROLLO INDUSTRIAL EN

ANA URABE DE
1978



Tesis doctoral dirigida por D. Eduardo García Peregrín, profesor agregado de Bioquímica de la Facultad de Ciencias. Fue leída el día 29 de Septiembre de 1978, ante el tribunal formado por los profesores: Guirao Pérez; Abadía Fenoll; Sánchez de Medina Contreras; García Peregrín; López Rodríguez. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

Mi agradecimiento a D. Fermín Sanchez de Medina, Director del Departamento de Bioquímica.

Al Prof. Dr. D. Eduardo García Peregrín Director de esta tesis, mi gratitud por haberme iniciado en la investigación bioquímica, y por la ilusión y constante orientación con que ha seguido la realización de este trabajo.

A Juan Antonio Aguilera Mochón, Lola Gonzalez Pacanoska , Carmen Marco de la Calle y Matilde Barón Ayala por la gran ayuda que de ellos he recibido.

A Juan García Martínez, M^a Dolores Suárez, Hilario Ramirez, Josefa L. Segovia, M^a Dolores Franco, María Romero , Alberto Vargas y demás compañeros del laboratorio por su amistad y colaboración

A Pepe, a Eva

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
c. p. m.	Cuentas por minuto
D. O.	Densidad óptica
D. p. m.	Desintegración por minuto
DTNB	Acido 5-5'ditiobis (2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
F-PP	Farnesil pirofosfato
G-PP	Geranil pirofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
HMG	Acido 3-hidroxi-3-metil-glutárico
Ip-P	Isopentenil fosfato
Ip-PP	Isopentenil pirofosfato
ITP	Inosín trifosfato
JH	Hormona juvenil
ME	Mercapto etanol
MVA	Acido mevalónico
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
P-MVA	Acido fosfomevalónico
PP-MVA	Acido pirofosfomevalónico
p-HMB	Para hidroximercuribenzoato
UTP	Uridín trifosfato

INDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCION</u>	19
<u>I. - PARTE TEORICA</u>	25
1. 1. - <u>Biosíntesis del colesterol</u>	27
1. 1. 1. - Ruta metabólica	27
1. 1. 2. - Algunos aspectos de la regulación de la biosíntesis del colesterol a partir del MVA.	32
1. 1. 3. - Aspectos fisiológicos	38
1. 2. - <u>Biosíntesis del colesterol en pollo</u>	41
1. 3. - <u>Importancia del riñón en el metabolismo del MVA</u> ...	49
1. 4. - <u>Importancia del cerebro en el metabolismo del MVA.</u>	54
1. 5. - <u>Enzimas que catalizan la fosforilización del MVA</u> ..	56
1. 5. 1. - Mevalonato cinasa	56
1. 5. 2. - Fosfomevalonato cinasa	85
<u>II. - PLAN DE TRABAJO.</u>	91
<u>III. - PARTE EXPERIMENTAL.</u>	95
3. 1. - <u>Material y métodos.</u>	97
3. 1. 1. - Material biológico	97
3. 1. 2. - Preparaciones enzimáticas.	97
3. 1. 3. - Preparación de tampones	98
3. 1. 4. - Determinación del contenido protéico.	98
3. 1. 4. 1 - Curva patrón de la albúmina.	98
3. 1. 4. 2. - Metódica	99
3. 1. 4. 3. - Cálculos.	100
3. 1. 4. 4. - Reactivos.	100
3. 1. 5. - Determinación de la actividad enzimática.	102

	<u>Página</u>
3. 1. 5. 1. - Reacciones enzimáticas.....	102
3. 1. 5. 2. - Reactivos utilizados.....	102
3. 1. 6. -Determinación y medida de los productos de la reacción.....	103
3. 1. 6. 1. - Radiocromatografía en papel.....	103
3. 1. 6. 2. - Detección y medida de radiactividad.	105
3. 1. 6. 3. - Expresión de la actividad específica.	105
3. 2. - <u>Resultados</u>	108
3. 2. 1. - Fosforilación del ácido mevalónico en cerebro de pollo recién nacido	108
3. 2. 1. 1. - Influencia de la concentración de pro- teínas de los extractos enzimáticos..	108
3. 2. 1. 2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones	108
3. 2. 1. 3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA	110
3. 2. 1. 4. - Distribución intracelular de los enzi- mas fosforilantes del MVA	110
3. 2. 1. 5. - Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA	113
3. 2. 1. 6. - Efecto de los nucleótidos	113
3. 2. 1. 7. - Efecto de los cationes divalentes	116
3. 2. 1. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos - SH	122
3. 2. 1. 9. - Efecto de algunos inhibidores de gru- pos -SH	122
3. 2. 1. 10. -Influencia de la edad del pollo	126
3. 2. 1. 11. -Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta	129
3. 2. 1. 12. -Influencia del ayuno	132
3. 2. 1. 13. -Influencia del ritmo luz-oscuridad...	132

3. 2. 2. -Fosforilación del ácido mevalónico en riñón de pollo recién nacido	135
3. 2. 2. 1. - Influencia de la concentra- ción de proteínas de los ex- tros enzimáticos.....	135
3. 2. 2. 2. - Influencia del tiempo de in- cubación de las reacciones.....	135
3. 2. 2. 3. - Efecto del pH sobre la for- mación de derivados fosfo- nilados del MVA	137
3. 2. 2. 4. - Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico.....	140
3. 2. 2. 5. -Estabilidad térmica de la me- valonato cinasa y fosfomevalo- nato cinasa.....	140
3. 2. 2. 6. - Efecto de los nucleótidos	143
3. 2. 2. 7. - Efecto de los cationes divalentes..	145
3. 2. 2. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos - SH	148
3. 2. 2. 9. - Efecto de algunos inhibidores de grupos - SH	152
3. 2. 2. 10. -Influencia de la edad del pollo ...	155
3. 2. 2. 11. -Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta	155
3. 2. 2. 12. -Influencia del ayuno	159

3. 2. 2. 13. - Influencia del ritmo luz-oscu-
ridad 159

IV. - DISCUSION 162

V. - CONCLUSIONES 181

VI. - BIBLIOGRAFIA 187

INTRODUCCION

INTRODUCCION

En términos generales, se han observado características comunes y diferenciales en el metabolismo en mamíferos y aves. Concretamente en el metabolismo lipídico, el pollo difiere en varios aspectos de los mamíferos. Así, mientras en la rata el tejido adiposo es el principal responsable de la síntesis de ácidos grasos, en el pollo esta síntesis se localiza fundamentalmente en el hígado, lo que sugiere que la función del tejido adiposo es principalmente de almacenamiento y eliminación de lípidos más que una función de síntesis como es el caso de la rata.

Por otra parte, aunque la mayoría de los animales y el propio hombre son capaces de sintetizar gran parte del colesterol que requieren, los datos en el pollo son contradictorios, desconociéndose con seguridad si el colesterol de los tejidos de pollo recién nacido ha sido transferido desde la yema del huevo ó ha sido sintetizado en tejidos propios del polluelo ó en las membranas embrionarias. Diversos investigadores sostienen que en el embrión debe ocurrir, al menos en parte, la biosíntesis del colesterol, biosíntesis que debe ser especialmente activa en el cerebro, si bien la mayor parte del colesterol del polluelo procede del saco vitelino.

En efecto, a lo largo del desarrollo y del crecimiento ocurren profundos cambios en la estructura y función del sistema nervioso que concierne específicamente a las alteraciones en la concentración y composición de los lípidos y a los cambios en su metabolismo. Desde que los

primeros estudios de Schmidt y de Fernandez-Morán demostraron que la mielina está constituida por capas alternas de lípidos y proteínas, son muchos los trabajos llevados a cabo con objeto de conocer sus caracteres histoquímicos y bioquímicos. Todos ellos coinciden en demostrar que el colesterol es el componente mayoritario de la mielina, habiéndose considerado que, en conjunto, constituyen alrededor del 20% de todos los lípidos del cerebro. Las especies animales que han sido estudiadas más intensamente en este aspecto son los mamíferos y entre ellos, concretamente, la rata y el ratón. Los datos en el hombre, que lógicamente son de la mayor importancia, son muy escasos.

El desarrollo de la mielina en el hombre ocurre antes del nacimiento y continúa durante varios años después. Durante este periodo, la proliferación glial y el depósito de mielina coinciden con un incremento en la coordinación de movimientos. La mielinización óptima depende de la presencia de varias hormonas y de un adecuado estado nutricional durante el desarrollo. Una mielinización precoz puede afectar a la maduración cerebral, implicando una proliferación glial y otros efectos que originan un cerebro anormalmente pequeño.

En el pollo, el proceso de mielinización ocurre durante la fase embrionaria, por lo que este animal, al igual que el cobjaya, nace virtualmente mielinizado. Así pues, la química del pollo en su estado embrionario y postnatal puede aportar luz a los problemas presentados en otros animales en su periodo perinatal.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia del colesterol en el sistema nervioso, los pasos individuales de su biosíntesis no han sido estudiados con detalle en el cerebro. La secuencia de reacciones por las que se biosintetiza el colesterol a partir de acetil-CoA constituye uno de los pasos metabólicos más complejos en las células eucarióticas. En la biosíntesis del colesterol suelen distinguirse dos grandes etapas claramente diferenciadas. La primera comprende la transformación del acetato en mevalonato, mientras que la segunda consiste en la transformación de mevalonato en colesterol, vía isopentenil pirofosfato y escualeno. Aunque esta segunda etapa no parece estar tan bien controlada como la primera, en mamíferos se ha demostrado su regulación a nivel de la mevalonato cinasa por diversos intermediarios del proceso, como son el geranyl-pirofosfato y el farnesil-pirofosfato. Asimismo, en ratas se ha demostrado un cierto efecto inhibitor del propio colesterol sobre la fosforilación del ácido mevalónico.

En los últimos años se ha demostrado que el colesterol y otros derivados isoprenoides no son los únicos productos resultantes del metabolismo del ácido mevalónico. Algunos tejidos, como el cerebro de la rata recién nacida, incorporan cantidades significativas de ácido mevalónico a ácidos grasos mediante un proceso conocido con el nombre de "shunt" del mevalonato, en el cual el dimetilalilpirofosfato es transformado en β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA vía dimetilacrilil-CoA y metilglutaril-CoA. El HMG-CoA es entonces transformado en acetoacetato y éste en acetil-CoA, sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos.

El descubrimiento de esta vía metabólica ha abierto nuevas líneas de investigación en este campo. Concretamente en rata, más de la mitad de la cantidad total de mevalónico que es incorporado via "shunt" para formar compuestos no esteroídicos parece ser metabolizado por los riñones. Esta consistente localización renal del "shunt" contrasta con la distribución tisular de la vía que conduce a los esteroides, en la que el hígado manifiesta aproximadamente la misma actividad que el riñón, siguiéndole en importancia la contribución del cerebro.

Recientemente parece haberse demostrado que los cuerpos cetónicos juegan un papel fundamental en el sistema nervioso central durante el proceso de mielinización, no solo como fuentes de energía sino también como suministradores de esqueletos carbonados para la biosíntesis lipídica.

Resulta de todo ello que existe una clara interdependencia entre hígado, riñón y cerebro durante la mielinización, no solo en lo que respecta al aprovechamiento del colesterol y ácidos grasos por el cerebro sino también por cuanto el hígado es el órgano productor de los compuestos cetónicos. Es posible que la intervención del tejido renal en el metabolismo de los cuerpos cetónicos durante la mielinización en el pollo sea semejante a lo que ocurre en ratas lactantes. Sin embargo es muy poco lo que se sabe del metabolismo en el pollo durante su desarrollo embrionario y postnatal, por lo que la participación del cerebro, riñón e hígado deberá ser confirmada experimentalmente.

En este sentido, en la presente Memoria Doctoral hemos comenzado el estudio de las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico, como primeras etapas de su incorporación a esteroides y compuestos no isoprenoides, por preparaciones enzimáticas de cerebro y de riñón de pollo recién nacido. Se han escogido pollos desde el momento de la eclosión hasta los diez días de vida, estudiando en ellos las variaciones exhibidas por las dos primeras actividades enzimáticas de la ruta biosintética mencionada. En otros trabajos actualmente en realización en nuestro Departamento, se está llevando a cabo el estudio del mismo proceso durante la fase embrionaria, completando con ello el conocimiento de la contribución que los tres órganos antes reseñados presentan en las primeras fases de la incorporación del ácido mevalónico a lo largo de la mielinización del pollo

Con este mismo objeto, se presentan en esta Memoria Doctoral los resultados obtenidos "in vitro" sobre las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico, que han permitido poner de manifiesto algunas de las propiedades de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo recién nacido.

Asimismo se ha estudiado la posible influencia que la alimentación puede tener sobre ambas actividades enzimáticas, bien directamente mediante la suplementación de colesterol a la dieta ó mediante el ayuno ó bien indirectamente sometiendo a los animales a un ritmo cíclico de luz-oscuridad. La corta edad de los animales utilizados en estas experiencias hace que los resultados obtenidos en este aspecto no

sean completamente definitivos, debiéndose completar posteriormente con pollos adultos que puedan ser sometidos a análogos tratamientos pero más prolongados.

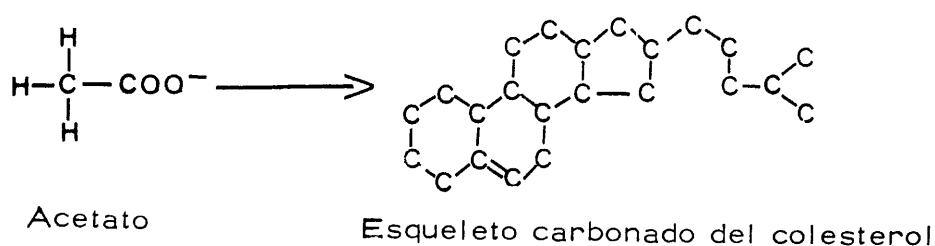
I. - PARTE TEORICA

1.1. - Biosíntesis del colesterol

1.1.1. - Ruta metabólica

Durante los últimos años se han publicado algunas revisiones que han tratado de aspectos de la biosíntesis de compuestos isoprenoides. E. D. Beytia y J. W. Porter (1) hicieron una evaluación crítica de las investigaciones más recientes sobre las reacciones que dan lugar a la formación de dichos compuestos.

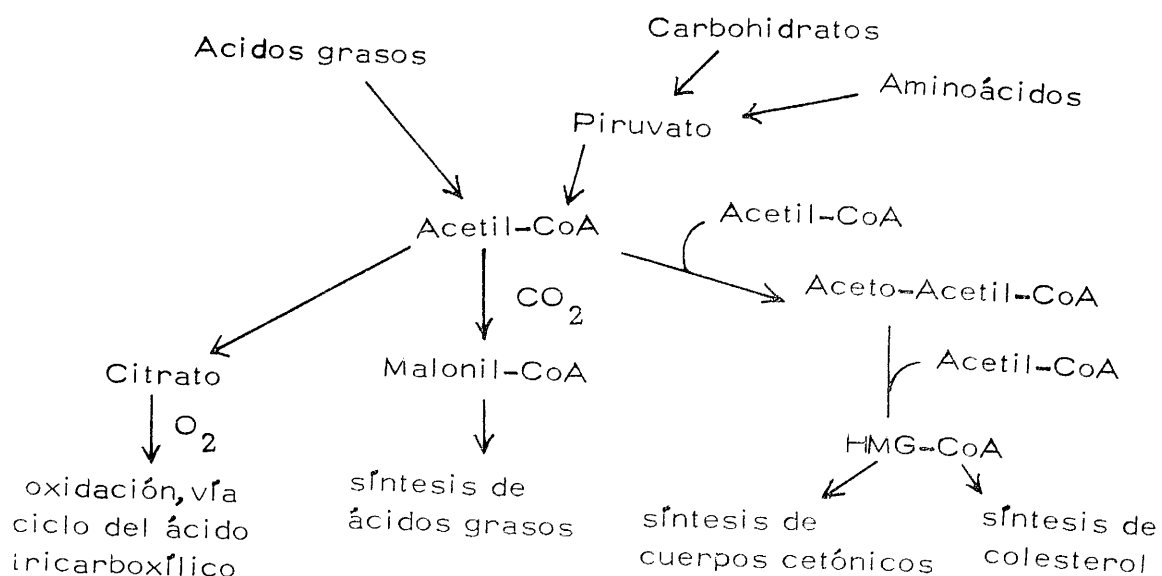
Con respecto a la biosíntesis del colesterol contemplaron las aportaciones de Bloch y de Caszforth y Popjak que han demostrado que el esqueleto carbonado del colesterol deriva completamente del acetato. A principios de los años 40. Bloch y col demostraron que los átomos de carbono de un acetato marcado isotópicamente en sus carbonos y administrado por vía oral a ratas se incorporaban al colesterol del hígado. Descubrieron que tanto el núcleo esteroide como la cadena lateral de ocho carbonos del colesterol aparecían marcados.



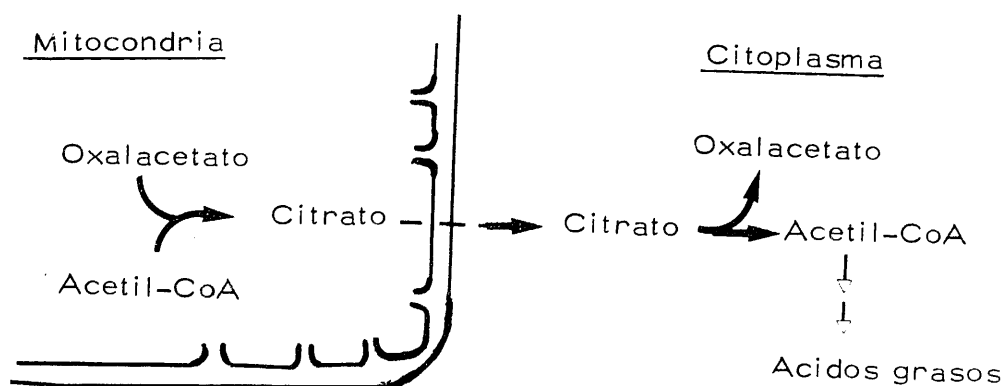
Tanto el carbono del grupo metilo como el del grupo carboxilo se incorporan al colesterol en cantidades aproximadamente iguales, de hecho todos los átomos de colesterol proceden del acetato.

El descubrimiento de la ruta que siguen los carbonos del acetato hasta la formación de isopreno activo ha permitido un examen exhaustivo de los compuestos C_5 y C_6 como posibles precursores de isoprenoides. El descubrimiento del ácido mevalónico, (revisado por Wagner y Folkers (2)) y el hallazgo por Tavormina y col (3) de que este compuesto es un buen precursor del colesterol abrió el estudio de las reacciones intermediarias de la biosíntesis de isoprenoides.

La biosíntesis del ácido mevalónico se ha estudiado por sistemas enzimáticos solubles y por sistemas enzimáticos microsomales y solubles. Actualmente la primera vía puede considerarse de menor importancia, ó incluso constituida artificialmente durante el proceso de homogeneización por desorganización de los compartimentos celulares. En la segunda vía, la más importante, todos los intermediarios estan unidos al CoA. La primera reacción es la activación del acetato a acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa en el citoplasma, aunque este compuesto puede formarse a través de una gran variedad de rutas metabólicas tales como la oxidación de ácidos grasos y la descarboxilación oxidativa del piruvato.

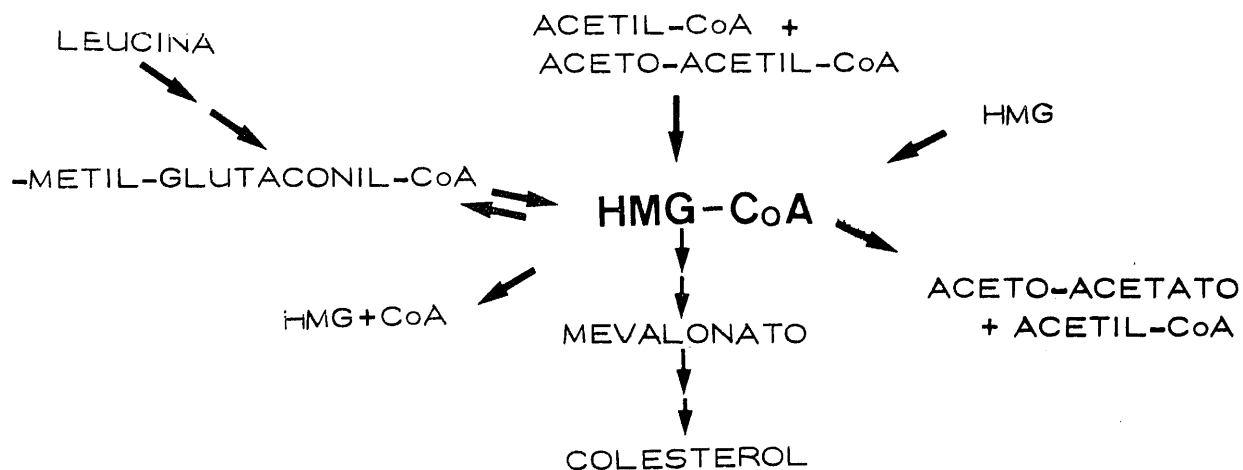


El acetil-CoA es un sustrato común a la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos. Para el control de la biosíntesis del colesterol son importantes los mecanismos de regeneración de acetil-CoA extramitocondrial, por lo que un punto de control es el paso del acetil-CoA procedente de la oxidación de ácidos grasos y descarboxilación oxidativa del piruvato, procesos que tienen lugar dentro de la mitocondria, a través de la membrana mitocondrial por la lanzadera de citrato principalmente(4).

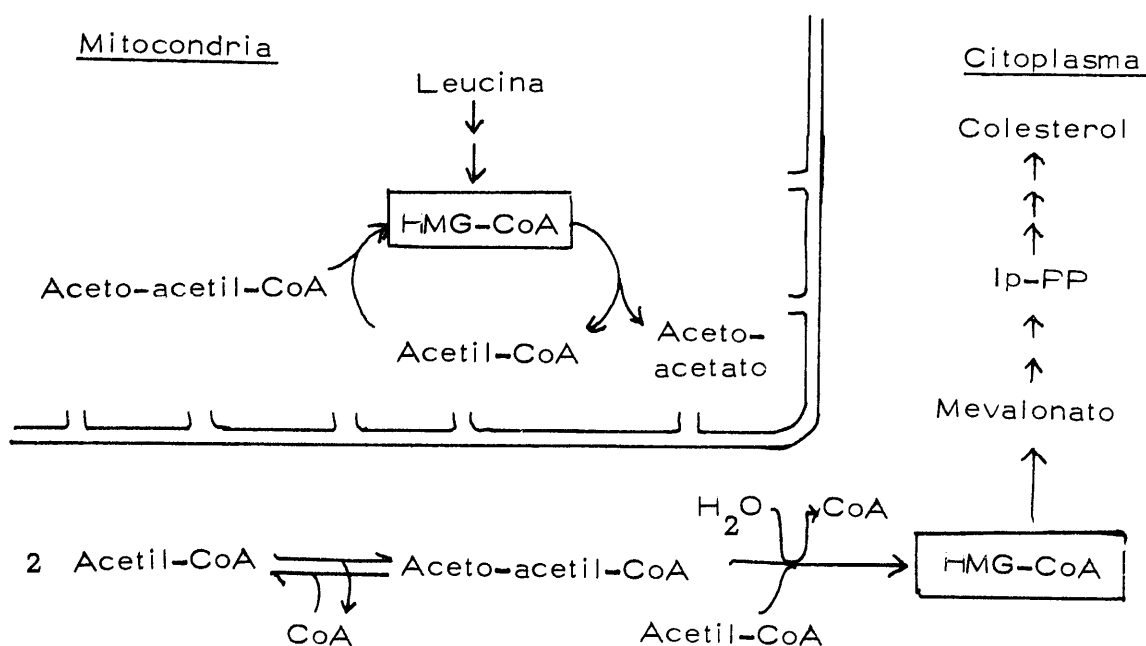


Dos moléculas de acetil-CoA se unen para formar aceto-acetil-CoA; esta reacción es catalizada por una tiolasa en la fracción microsomal. Bajo condiciones fisiológicas la reacción catalizada por la tiolasa favorece la formación de Aceto-acetil-CoA ya que este producto es movilizado por la reacción siguiente que sintetiza el β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA. La síntesis del HMG-CoA a partir de aceto-acetil-CoA y acetil-CoA es catalizada por la HMG-CoA sintetasa en la fracción soluble.

El HMG-CoA participa en varias vías metabólicas:



La formación de ácido mevalónico requiere la reducción del HMG-CoA por la HMG-CoA reductasa. Este sistema enzimático está siendo intensamente estudiado ya que la reacción que cataliza es el paso limitante de la biosíntesis del colesterol en hígado bajo la mayor parte de las condiciones. La regulación de la HMG-CoA reductasa ha sido revisada recientemente (5). Sin embargo es necesario considerar la compartimentación de la síntesis de colesterol y la formación de cuerpos cetónicos para poder explicar la regulación de ambas vías metabólicas (4) y reafirmar así el papel regulador de la HMG-CoA reductasa.



El paso de ácido mevalónico a isopentenil pirofosfato es catalizado por tres enzimas: mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa, de cuyas características se hace una amplia revisión en el apartado 1.5 y la fosfomevalonato descarboxilasa que ultimamente también se está estudiando como enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol (6).

La biosíntesis de pirofosfatos alílicos implica la isomerización del isopentenil-PP (Ip-PP) a un compuesto alílico, dimetil-alil-PP y la condensación cabeza cola de Ip-PP y dimetil-alil-PP para dar sucesivamente geranil ó meryl-PP (trans ó cis, C₁₀) y farnesil-PP (C₁₅). La condensación de dos moléculas de farnesil-PP

da un intermediario C₃₀, preescualeno pirofosfato, el cual es convertido en escualeno en presencia de NADPH; ambas reacciones, condensación y reducción, son llevadas a cabo por el mismo sistema enzimático (1). La reacción de formación del lanosterol tiene lugar en los microsomas pero con la participación de dos proteínas citoplasmáticas portadoras de esteroides. Desde el lanosterol se puede formar colesterol ya sea pasando por el desmosterol ó por el 7-dehidroxilesterol. R.C. Johnson y col (7) han hecho un estudio comparativo de la biosíntesis de colesterol a partir de escualeno, lanosterol y desmosterol en la fracción microsomal de cerebro, hígado corazón y riñón.

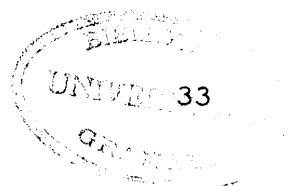
1.1.2. - Algunos aspectos de la regulación de la biosíntesis de colesterol a partir del MVA

La incorporación de MVA a colesterol y compuestos relacionados, ha sido estudiada en diversos orígenes y condiciones experimentales. Así, se ha puesto de manifiesto en hígado de diversas razas de ratones (8, 9) en riñón e hígado de hamsters, perro y oveja (10) y en homogenados de aorta de cerdo (11, 12) Edgren y Helltrön (13), después de la inyección parenteral de MVA-2-¹⁴C observaron que aparecen más productos marcados en el riñón que en el hígado. Mientras que en el hígado la mayor parte de la radiactividad aparece como colesterol, en el riñón se encuentra repartida entre escualeno y lanosterol.

Entre todos los factores que intervienen en la regulación de la biosíntesis del colesterol, los más estudiados son el ritmo luz-oscuridad, el desarrollo y la alimentación.

Back y col (14) encontraron que la incorporación de MVA a esteroides no varia significativamente entre el medio-día y la media-noche . Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hickman y col (15). Sin embargo recientemente los trabajos de Bhat y Ramasarma (16) han demostrado la existencia de ritmo diurno en la conversión de MVA a esteroides; ritmo que sería debido a la conversión de MVA a isopentenil-PP ya que experiencias paralelas de medida de $^{14}\text{C O}_2$ procedente de descarboxilación de MVA-1- ^{14}C muestran las mismas variaciones a lo largo del día. Estas discrepancias pueden deberse a que Baht y Ramarma trabajaron con una concentración de MVA 50 veces superior a la requerida para la saturación de sustrato.

i En las primeras etapas del desarrollo animal, cuando todavía es lactante, la incorporación del MVA a esteroides es baja mientras que en animales destetados esta incorporación es considerablemente mas alta. Según esto, Shah (17) indica que la actividad de una ó más enzimas de esta vía metabólica cambia a partir del destete del animal y pueden actuar como enzimas reguladoras en la síntesis del colesterol en ratas lactantes, en las que esta reducción en la síntesis del colesterol puede estar causada por el colesterol de la leche materna.



Jhonson y Shah (18) estudian la formación de colesterol a partir del MVA en ratas lactantes así como en ratas destetadas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol. En las ratas alimentadas así, disminuye la formación de colesterol con respecto a animales alimentados con dieta estandar. En experiencias con ratas sometidas a ayuno, realimentando después con dieta normal, se observa que aumenta la formación de esteroides después de la alimentación, aumento que es suprimido si la alimentación se hace con una dieta suplementada con colesterol.

Estudios más recientes de Ramachandran y Shah (6) demuestran que la descarboxilación del PP-MVA es más alta en ratas destetadas que en ratas lactantes. Esta descarboxilación disminuye un 50 - 80 % en ratas destetadas y alimentadas con una dieta suplementada con colesterol. Esto parece demostrar que la etapa de formación del isopentenil-PP es limitante en la conversión del MVA a esteroides.

Gould y Swyoyd (19) han observado una inhibición de la conversión del MVA en colesterol en hígado de ratas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol, inhibición que es total al año de someter al animal a esta alimentación. Con objeto de establecer el punto en el que se dá la inhibición, los autores han hecho experiencias en distintas etapas de esta vía metabólica demostrando que la conversión de escualeno a colesterol no disminuye, aunque sí lo hacen las etapas de farnesil PP a colesterol y de MVA a farnesil-PP. De todas formas, la inhibición observada en la conversión de MVA a colesterol es menor que la observada a partir de acetato.

En ratas alimentadas con una dieta rica en ácido cólico, la síntesis de colesterol a partir de MVA se inhibe un 40% mientras que a partir de acetato se inhibe casi completamente.

Sin embargo, Shapiro y Rodwel (20) han encontrado que después de 10 h de alimentación con una dieta rica en colesterol no se afecta la conversión de MVA en colesterol.

El ayuno inhibe casi totalmente la formación de colesterol a partir de MVA. Pero según Slakey y col (21) la realimentación con una dieta libre de grasas aumenta esta biosíntesis hasta sus valores normales a las 72 horas.

La necesidad de una fuente calórica es indispensable para la biosíntesis de colesterol pues, según Subbarao y Ramansarma (22) la inyección de ATP a animales que tienen bajo nivel de síntesis de colesterol debido al ayuno, hace que aumente esta biosíntesis aunque el ATP tiene influencia en una etapa anterior al MVA pues la formación de esteroides a partir de MVA no se afecta con esta inyección de ATP.

En ratas inyectadas con MVA y alimentadas con colesterol en la dieta, Raicht y col (23) han observado que aumenta la absorción de colesterol y unido a ello se inhibe su biosíntesis. Sin embargo la adición de β -sitosterol a la dieta inhibe totalmente la absorción de colesterol y aumenta ligeramente su síntesis.

Cuando los animales ingieren una dieta normal suplementada con 5% de colesterol Wiss (24) ha encontrado una ligera inhibición en la formación de colesterol a partir de MVA, aumentando al mismo tiempo la formación de lanosterol y escualeno. El mismo autor (25) ha encontrado que la conversión de MVA a colesterol se inhibe alimentando al animal con una dieta lipogénica de alto contenido en glucosa (70%) localizándose esta inhibición entre lanosterol y colesterol.

En animales sometidos a una hepatectomía parcial, no aumenta la síntesis de colesterol a partir de MVA después de la operación. La posterior alimentación con una dieta rica en colesterol tampoco cambia esta incorporación con respecto a animales control.

La influencia de ciertos aniones minerales sobre la biosíntesis del colesterol a partir de MVA ha sido estudiado por Rodriguez y Leal (26). La radiactividad incorporada al colesterol, es menor en presencia de fluoruro que en presencia de cloruro, tanto más cuanto la concentración de los iones en el medio es mayor. Asimismo el ion fluoruro no parece ejercer un efecto inhibitorio de este proceso ya que al aumentar la concentración de ión disminuye la conversión de MVA a colesterol.

Horuby y col (27) han estudiado el efecto de los grupos tiol sobre la síntesis del colesterol a partir de MVA. En presencia de β -mercaptoetanolamina, β -mercaptoetano y etanotiol se ha observado cierta inhibición de este proceso, acumulándose lanosterol y Δ^8 lanosterol. La cisteína y el glutatión también producen inhibición pero no acúmulo de los intermediarios citados.

Kuroda y Eudo (28) han estudiado "in vitro" la inhibición de la biosíntesis del colesterol por ácidos grasos. La incorporación del MVA es inhibida por ricinoleato (hidroxiácido) y fitanato (ramificado) en una etapa comprendida entre el escualeno y el lanosterol. En presencia de triarimol, que es un inhibidor de la eliminación del grupo 14-metil del lanosterol y sus metabolitos, se ha encontrado una fuerte inhibición de la incorporación de MVA a colesterol y precursores (29) observándose además acumulación de lanosterol y 24, 25-dihidrolanosterol.

En la grasa del epidídimo Durr (30) ha estudiado la incorporación de MVA a esteroides observando que 70 horas de ayuno reduce esta incorporación al 30% con respecto a ratas alimentadas. La adición de glucosa no estimula la incorporación de MVA y de hecho a altas concentraciones de glucosa inhibe el proceso tanto en animales alimentados como ayunados. Por otra parte el citrato es estimulante pero no restaura completamente la actividad. En presencia de inhibición del mecanismo de producción o utilización de energía se inhibe la utilización del MVA en la síntesis de esteroides. También inhiben este proceso los ácidos biliares taurocólico y glicocólico. Durr y Murad (31) han estudiado la incorporación de MVA por la mucosa intestinal de rata. El glutatión reducido y el ácido ascórbico inhiben un 50% este proceso mientras que el DTT y la cisteína no tienen ningún efecto. También inhiben la incorporación de MVA los ácidos biliares.

1. 1. 3. - Aspectos fisiológicos

En todo organismo en estado estable cada parte componente tiene un equilibrio dinámico; ésto implica que la suma de los productos de entrada es igual a la suma de los productos de salida. Hay dos procesos de entrada en el caso del colesterol: absorción intestinal del colesterol de la alimentación y biosíntesis (32), y dos principales procesos de salida: Transformación en ácidos biliares (33) y excreción (34).

Con métodos de trazas nucleares y técnicas "in vitro" se ha avanzado mucho en el estudio de la biosíntesis del colesterol, aunque las principales evidencias de biosíntesis fueron encontradas "in vivo" (32). Un experimento muy usado "in vitro" con el que se han obtenido muchas de las conclusiones citadas en apartados anteriores, es la incubación de cortes de un órgano en un medio nutritivo adecuado a 37°C con un precursor del colesterol marcado y después de una ó dos horas de incubación se aísla el colesterol. Entonces se determina el porcentaje de actividad ^{14}C de precursor encontrado en el colesterol.

Desde el punto de vista fisiológico las preguntas que han de ser contestadas son: ¿Se sintetiza el colesterol en todos los órganos del cuerpo? ¿Con qué velocidad ocurre esta síntesis? ¿La velocidad de síntesis está ajustada a la cantidad de colesterol ingerido?. La respuesta a la primera pregunta se encontró en 1946 (35, 36) usando técnicas "in vitro" y los resultados han sido repetidamente confirmados (37, 38). La respuesta a la segunda pregunta ocurrió en 1950

(39, 40). La conclusión propuesta es que el órgano más importante para la biosíntesis del colesterol es el hígado porque es en este órgano donde se observa el porcentaje de precursores a colesterol más alto (37, 38). Ahora este punto de vista es aceptado ampliamente y demostrado (41, 42). Además cuando el colesterol es añadido a la comida de animales la incorporación de los precursores en hígado está considerablemente reducida como resultado de la inhibición de la β -hidroxi β -metil-glutaril-CoA-reductasa.

En el estudio de la biosíntesis del colesterol surge otra dificultad que es la movilidad de las moléculas de colesterol (43, 44, 45). En efecto, hay cambios por momentos entre el colesterol del plasma el cual constituye un "compartimento central" y el colesterol de los órganos el cual presenta un "comportamiento periférico".

Sobre la velocidad a la que estos cambios tienen lugar se sabe muy poco aunque puede ser muy rápida como en el caso de los eritrocitos (46, 47). Experimentos "in vivo" después de la administración de colesterol marcado demuestran que los cambios en la actividad de un órgano tienen lugar siguiendo un patrón cinético, que depende en parte de la síntesis ocurrida "in situ" y en parte de los cambios entre el órgano y el plasma. Así, estos estudios han permitido definir de forma precisa las características funcionales de la síntesis en órganos mediante técnicas cinéticas. Sin embargo, no se sabe realmente qué papel juegan los órganos, independientemente unos de otros y todos como un sistema en armonía, especialmente el hígado, en la secreción interna del colesterol.

En experimentos en los que se utiliza en la dieta colesterol radiactivo, que hacen posible ver la secreción interna de colesterol, se demuestra que hay grandes diferencias del comportamiento "in vivo" e "in vitro". El método del equilibrio isotópico descrito primero en 1956 (43), estandarizado en 1966 (48) y revisado en 1972 (49) hace posible que F. Chevallier y col (50) aborden los problemas de la biosíntesis del colesterol, encontrándose con la sorpresa de que alimentando con colesterol en una serie de proporciones 1:7, 1:40 y 1:130 no se altera la secreción interna, además la biosíntesis era significativamente más alta, bajo un régimen de concentración más rica. Estos resultados no son como los obtenidos "in vitro" y además sugieren que al no corresponder la regulación inhibitoria descrita "in vitro" en hígado con los hechos observados "in vivo", ó que el hígado no es el mejor responsable de la biosíntesis del colesterol en el cuerpo ó que el mecanismo regulatorio opera en el hígado pero no gobierna el balance en el cuerpo totalmente.

Más recientemente se ha demostrado indirectamente (51, 52) y directamente (53) que el tracto digestivo (especialmente del intestino) es reponsable por lo menos del 56% de la biosíntesis del colesterol de ratas adultas machos.

1. 2. - Biosíntesis del colesterol en pollo

La mayoría de los estudios bioquímicos en las aves han sido llevados a cabo durante los últimos 15 años y se han centrado principalmente en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. La mayoría de los trabajos han sido hechos usando aves domésticas. Estas investigaciones han demostrado que cualitativamente la mayoría de las vías metabólicas son similares en aves y mamíferos pero hay importantes diferencias cuantitativas en las actividades relativas de alguna de esas vías y de enzimas individualmente consideradas.

Con respecto a la lipogénesis se ha comprobado en pollo (54, 55) que el tejido adiposo puede incorporar glucosa y acetato a ácidos grasos pero en comparación con la rata estos sustratos son utilizados más rápidamente por el tejido de la rata (56, 55). La velocidad de incorporación de glucosa a ácidos grasos en el pollo es mucho mayor en el hígado que en el tejido adiposo (57, 55). Incluso se ha calculado (58) que el hígado es el responsable del 90 al 95% de la síntesis de ácidos grasos en el pollo. También se ha demostrado ser el hígado el mejor sitio para la lipogénesis en paloma (59, 60) y en pato (61)

Durante el desarrollo embrionario la lipogénesis es muy baja (62, 63) seguramente por el alto contenido en grasas de la yema del huevo en la que se desarrolla el embrión. Después de la eclosión, la alimentación cambia de un alto contenido en grasas del embrión a un alto contenido en hidratos de carbono de los cereales y la cantidad de lipogénesis del hígado aumenta rápidamente (57). En este sentido se

ha demostrado que las actividades de varias enzimas hepáticas implicadas en la conversión de glucosa a lípidos también se incrementan fuertemente durante el periodo postnatal. Sin embargo las actividades de las mismas enzimas en tejido adiposo de varias especies de aves permanecen bajas después del nacimiento hasta unas 4 semanas después de la eclosión.

Estudios "in vitro" y en pollos intactos demuestran pues, que el hígado es el mejor sitio para la biosíntesis de lípidos. Además, en pollo y seguramente en otras especies de aves, los ácidos grasos son sintetizados en el hígado y transportados como triglicéridos en el plasma, pasan a lipoproteínas de baja densidad y van al tejido adiposo para su almacenamiento. El pollo es por tanto, un animal modelo de un sistema bastante distinto de los animales normalmente empleados en el laboratorio, los roedores (64, 65) en los que los ácidos grasos son sintetizados principalmente en el mismo sitio donde se almacenan. Esto hace que se pueda usar un modelo no corriente para estudiar la regulación de síntesis de lípidos en un órgano, así como la regulación del transporte de lípidos. Además investigaciones de la lipogénesis hepática y su regulación en el pollo serían de considerable interés y pueden contribuir significativamente a nuestro entendimiento sobre la regulación del metabolismo de lípidos en el hombre ya que recientes estudios (66, 67, 68) indican que en el hombre, el hígado es también el mejor lugar de biosíntesis de ácidos grasos.

La dieta de grasas y proteínas, por diferentes mecanismos, ejerce un efecto sobre la síntesis hepática de lípidos. La capacidad

lipogénica en el pollo decrece marcadamente cuando se mantienen en ayunas durante cortos periodos de tiempo. Restringiendo la comida durante 2 h. decrece la lipogénesis hepática alrededor del 90% y realimentando durante 1 h ó con la administración intravenosa de glucosa ó fructosa se restaura la capacidad lipogénica. El mecanismo que se propone para esta regulación (70) implica que la depresión de la síntesis de ácidos grasos por ayuno ó alimentación grasa es acompañada y probablemente precedida de un incremento del nivel de ácidos grasos libres en el plasma. Bajo éstas condiciones aumenta el nivel de la cadena grasa de acil-CoA que inhibe el transporte de citrato a través de la membrana y la acetil-CoA carboxilasa, inhibiendo por tanto la síntesis de ácidos grasos. Así, medidas paralelas de síntesis de colesterol y ácidos grasos muestran la bajada total a los tres días de ayuno y una subida rápida con la realimentación.

Los pollos alimentados con una dieta de alto contenido de proteínas tienen una razón lactato / piruvato menor, esto indica una mayor oxidación citoplasmática. Este cambio del estado redox puede ser asociado con el control de la síntesis de lípidos. La tiroxina y el glucagón tienen efecto, la primera como activadora y el glucagón, como inhibidor; en la síntesis hepática de ácidos grasos, sin embargo la insulina parece tener un bajo papel.

R. A. Teekell y col (71) estudian el efecto del sexo y dieta de colesterol, esteárico, oléico y / ó linoléico en la deposición de colesterol en la sangre, hígado y aorta. Después de 5 meses de dieta de régimen a algunos de ellos se les administra oralmente $1-^{14}\text{C}$ acetato sódico y colesterol $1, 2, \text{H}^3$ para determinar si el colesterol que contienen los tejidos es de origen endógeno ó exogeno. Se observó que los machos tienen unos niveles de colesterol libre más altos que las hembras. La adición de colesterol (2%) y ácidos grasos (6%) incrementa los niveles de colesterol libre en el hígado y aorta. El colesterol almacenado en hígado y aorta se encuentra principalmente como colesterol libre mientras que en la sangre el colesterol está en forma esterificada. El colesterol en hígado y aorta es principalmente de origen endógeno.

En vista de que el sistema linfático del pollo es muy rudimentario, la gran cantidad de colesterol de la dieta es transportado en las dos formas libres y esterificado. Sin embargo las tres-cuartas partes del colesterol encontrado en la aorta era de origen endógeno, lo que sugiere que la dieta de colesterol con toda probabilidad juega un papel bastante pequeño en la arteriosclerosis en el pollo y que quizás el acetato ó la energía metabólica podría ser investigado como un mejor factor de esta enfermedad.

El contenido en colesterol en sangre y huevos de distintas razas de pollo ha sido estudiado por Shabalina (72) con objeto de establecer posteriores diferencias genéticas que influyen en la capacidad pro

ductora de las aves. Estos estudios se han llevado a cabo en pollos con niveles bajos y normales de catalasa en sangre . También se han estudiado los niveles de colesterol en diferentes tejidos como consecuencia de la alimentación con colesterol (73). En gallos alimentados con una dieta normal el contenido de colesterol de los tejidos es sorprendentemente similar al de los correspondientes tejidos en los mamíferos, excepto un bajo nivel en cerebro de pollo. La hipercolesterolemia en gallos alimentados con colesterol durante dos meses está asociada con un incremento del contenido del colesterol en todos los tejidos excepto en el cerebro , músculo y tejido adiposo. Las gallinas ponedoras con una mínima hipercolesterolemia tienen un contenido bajo en colesterol en la mayoría de los tejidos estudiados, pero las gallinas no ponedoras con una fuerte hipercolesterolemia muestran un contenido en colesterol relativamente moderado en algunos tejidos.

La alimentación es uno de los factores que más influyen en la regulación de la cantidad de colesterol biosintetizado y su contenido en diversos tejidos así como la prevención de enfermedades como la arterioesclerosis. En pollos alimentados con una dieta que contiene un 2% de colesterol durante seis semanas no se afecta el peso corporal ni el de la aorta (74), pero el colesterol en sangre aumenta al doble, al mismo tiempo que la cantidad de colesterol encontrado en la aorta es significativamente mayor. La alimentación con una dieta rica en glúcidos, no afecta a la concentración de colesterol en plasma, aunque este nivel aumenta si a la dieta se añade colesterol (75). En pollos alimentados con una dieta rica en grasas y glúcidos conteniendo también coles-

terol, el nivel de este metabolito en plasma no se afecta aumentando el nivel de triglicéridos (76).

Con objeto de estudiar el efecto de los esteroides vegetales sobre la concentración de colesterol en plasma e hígado, Sklan y col (77) alimentaron pollos con una dieta conteniendo colesterol y aceite de soja encontrando que los esteroides de este aceite disminuían la concentración de colesterol en ambos tejidos. Asimismo estudiaron la influencia de estos esteroides en la absorción y secreción de colesterol y ácidos biliares, viendo que se reducía la absorción de estas sustancias en el intestino. Se ha comprobado asimismo (78) el efecto de los esteroides vegetales sobre el contenido en colesterol de la yema de huevo. Cuando los animales consumen esta dieta la concentración de colesterol de la yema de huevo disminuye significativamente, aunque no varían el tamaño del huevo y de la yema, ni el peso de la cáscara. Tampoco hay diferencias apreciables en la producción de huevos.

Hwang y col (79) han estudiado el efecto de diversas sustancias antihipercolesterolemicas como colestiramina, esteroides de soja, etc, sobre la concentración de colesterol y vitamina A en animales normales e hipercolesterolemicos alimentados con una dieta suplementada con vitamina A ó β -caroteno. Los resultados indican que estas sustancias antihipercolesterolemicas, no solo influyen en los niveles de colesterol y ácidos biliares sino también en los niveles de vitamina A. Estos mismos autores (80) han estudiado el efecto de varios niveles de colestiramina y Sephadex, viendo que a medida que aumenta su concentración en la dieta, mayor efecto producen en los niveles de colesterol y vitamina A.

Uno de los aspectos más interesantes del metabolismo del colesterol, es la producción de hormonas esteroides sexuales y las segregadas por la corteza suprarrenal. En embrión de pollo, los andrógenos se sintetizan tres días antes de la diferenciación morfológica de las gónadas (81). La producción de andrógenos por las gónadas ya diferenciadas comienza a los seis días y medio de la incubación del huevo, siendo los testículos las gónadas de mayor producción seguido por el ovario izquierdo a partir de los nueve días y medio de la incubación.

Kalliecharan y Hall(82) han estudiado los niveles en plasma de embrión de pollo de cuatro hormonas a través del desarrollo. La concentración total de las hormonas progesterona, corticosterona, cortisol y cortisona se incrementa continuamente durante la última mitad del periodo de incubación, disminuyendo después del nacimiento. Ninguna hormona predomina sobre las otras durante el periodo estudiado, pudiendo considerarse que el cambio en la concentración de las hormonas no sigue un modelo común.

Los mismos autores han estudiado los niveles de las mismas hormonas en las glándulas adrenales del embrión de pollo (83). La concentración total de hormonas aumenta hasta el día 15 del desarrollo, disminuyendo después hasta el día 19 y luego vuelve a aumentar hasta el nacimiento. De acuerdo con anteriores trabajos (82) se puede concluir que varias hormonas corticosteroides se sintetizan en las glándulas adrenales y se secretan durante el desarrollo embrionario. En estas experiencias, el cortisol se ha medido usando una técnica radiactiva doble (84).

Boucek y Savard (85) han estudiado la incorporación de acetato en cortes de ovario de Gallus domesticus. El acetato se incorpora a progesterona, androstendiona testosterona y 17 β -estradiol. Estas hormonas se producen en cantidades diferentes según las hembras sean ponedoras o estén en periodo de muda. Las enzimas más activas de este proceso son la Δ^5 , 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Se ha estudiado también la capacidad esteroidogénica de los ovarios en relación con la edad del animal, siendo ésta mayor en pollos de un día que en adultos (86). La comparación de la capacidad esteroidogénica de ovarios y testículos demuestra que la de estos es menor en animales de un día, incrementándose con el desarrollo hasta superar a la de los ovarios en animales adultos. En hembras ponedoras de cinco y siete meses de edad (87) se estudia la formación de hormonas esteroídicas a partir de diversos precursores, indicando los resultados una posible implicación de las vías metabólicas de Δ^5 -C₁₉ en la formación de andrógenos por el ovario de las gallinas ponedoras.

De las enzimas que participan en la biosíntesis del colesterol en pollo se ha estudiado la HMG-CoA sintetasa (88, 89 , 90), viendo su localización en mitocondrias y citoplasma según la síntesis se dirija hacia cuerpos cetónicos ó colesterol, habiendo purificado además tanto la enzima mitocondrial como la citoplasmática. Asimismo la HMG-CoA reductasa de gallinas ponedoras ha sido purificada y caracterizada en 1977 por Beg y col (91) y la prenil-transferasa y su propiedades, han sido es-

tudiadas por King y Rilling (92). En hígado de pollo recién nacido García-Martínez (93) ha estudiado las características de la mevalonato-cinasa y fosfomevalonato cinasa así como su actividad a lo largo del desarrollo de cero a diez días.

1.3. - Importancia del riñón en el metabolismo del MVA

Contrariamente a lo que se creía, Hellström y col (94) demostraron que el riñón es el órgano donde mejor es observado y metabolizado el ácido mevalónico circulante. Esta conclusión la obtuvieron a partir de experiencias en las que seguían una inyección intravenosa de MVA-2-¹⁴C, observando que el riñón convertía aproximadamente cuatro veces más mevalonato a colesterol y precursores del colesterol, que el hígado (94). Además estudios "in vitro" en la corteza renal demostraron que el riñón es más activo en la síntesis de esteroides a partir de mevalonato que ningún otro tejido del cuerpo (95).

Edmand y Fogjak (96) demostraron que en ratas recién nacidas intactas, el MVA-2-¹⁴C inyectado puede servir no solo como un precursor del colesterol sino también como un sustrato para la síntesis de ácidos grasos de larga cadena. Además Fogelman y col (97) administrando MVA-5-¹⁴C "in vivo" observaron que se metabolizaban a ¹⁴-CO₂.

Estos hallazgos han conducido a la hipótesis de la existencia de un desvío de la ruta metabólica que conduce el MVA a la síntesis de esteroides, hacia la formación de aceto-acetato y acetil-CoA que

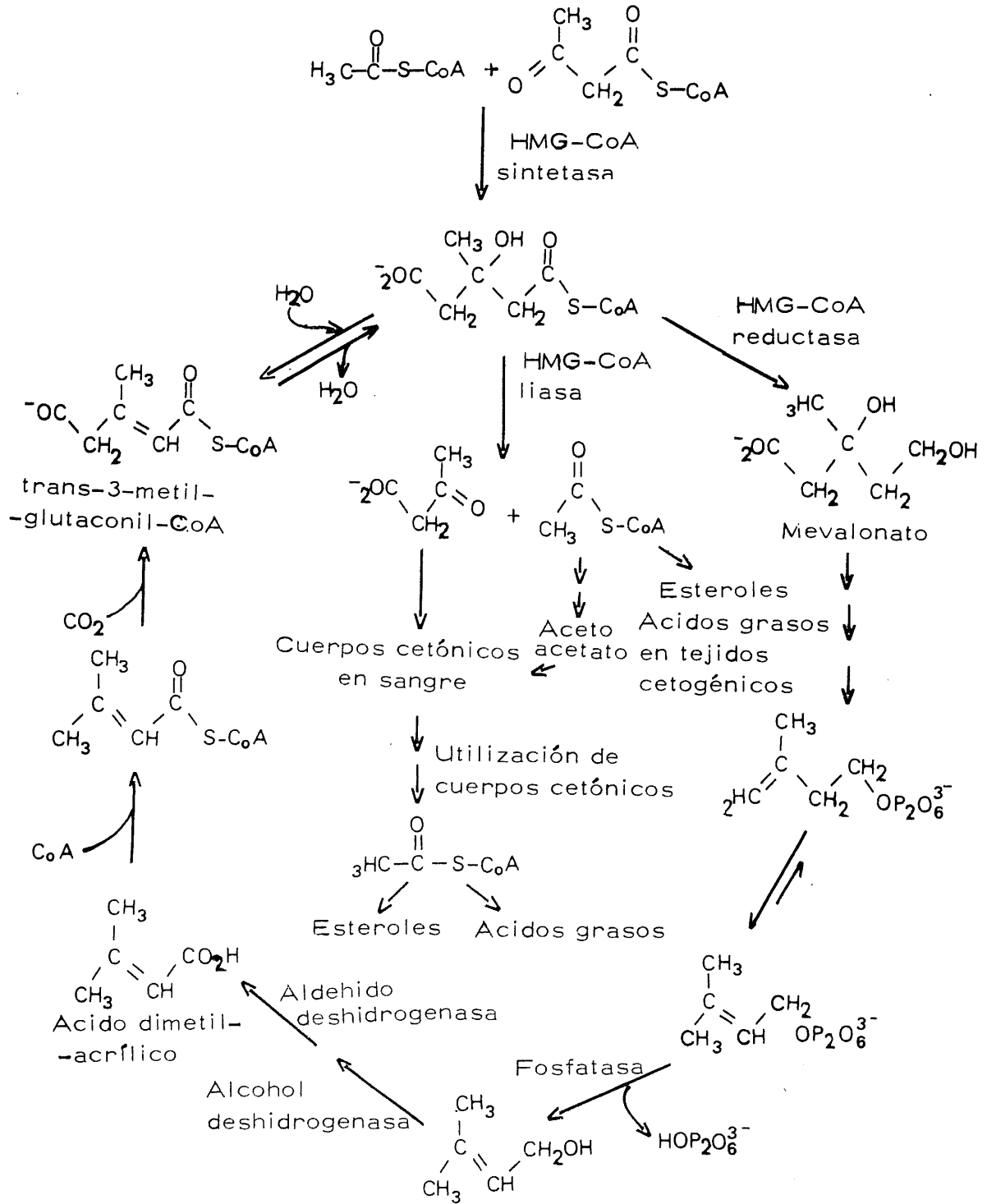
darán lugar a la formación de cuerpos cetónicos y ácidos grasos respectivamente .

De las tres rutas metabólicas que se postulan, la más aceptada (96) es la que da como posible que si la prenil-transferasa (farnesil-pirofosfato sintetasa), que cataliza la síntesis de geranil y farnesil-pirofosfato a partir de 3.3-dimetilalil e isopentenil-pirofosfato, fuera específicamente inhibida , la acumulación de dimetil-alil-pirofosfato, podría ser metabolizado por una vía que no llevara a la biosíntesis de esteroides. Esto implicaría que el alcohol dimetil-alílico, liberado de la hidrólisis del éster pirofosfato por una fosfatasa del retículo endoplásmico, sería deshidrogenado en dos pasos, a ácido dimetil acrílico (esquema nº 1), el cual después de la conversión a un éster-CoA, sería carboxilado a trans-3-metil-glutaconil-CoA, cuya hidratación generaría 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA. Este esquema tiene intermediarios comunes a la biosíntesis de esteroides a partir de mevalonato y de intermediarios del metabolismo de la leucina.

Con los métodos "in vivo" esta nueva ruta del ácido mevalónico que no lleva a la síntesis de esteroides, llamada "shunt" del mevalonato, solo ha podido ser demostrada de modo significativo en tres tejidos, cerebro, espina dorsal y piel de ratas recién nacidas, (96) pero no ha sido así con las técnicas "in vitro".

Los hallazgos en torno al "shunt" del mevalonato, al menos en tres tejidos de ratas recién nacidas, sugieren la idea de que el

Esquema nº1



Mecanismo hipotético para el reciclaje de los átomos de carbono.

riñón que es el lugar más activo de la síntesis de esteroides a partir del mevalonato circulante, posea también esta vía alternativa.

El trabajo de Edmand y Popjack (96) pudo demostrar, como se cita anteriormente, (el método empleado por estos autores es el de medida de C marcado radiactivamente) que el MVA se incorpora a ácidos grasos de larga cadena. Como consecuencia, la presencia de "shunt" probablemente no puede detectarse por esta técnica en un tejido como el riñón, el cual sintetiza muy pocos ácidos grasos.

Righetti y col (98) con una técnica "in vitro" con la que determinan la conversión de $\text{MVA-2-}^{14}\text{C}$ ó $\text{MVA-5-}^{14}\text{C}$ a $^{14}\text{CO}_2$ en cortes de tejido, además de confirmar los resultados anteriores de que el riñón es el órgano más significativo para la síntesis de esteroides a partir de mevalonato, miden un alto porcentaje de mevalonato metabolizado por el "Shunt" en riñón, ileon, bazo y testículos y con mucha menor cantidad en hígado, cerebro, piel y tejido adiposo. Además, el riñón metabolizaba por la ruta del "shunt" una cantidad de mevalonato 21 veces superior al resto de los tejidos examinados.

Estos resultados hacen ver al riñón como el órgano más importante en el metabolismo de ácido mevalónico por cualquiera de las vías hasta ahora conocidas.

Raskin y Siperstein (95) han estudiado recientemente la incorporación de MVA en distintas partes del riñón de rata. Sus resultados demuestran que la corteza renal es el lugar primario en que se metaboliza el MVA. En el mismo sentido, Edmond y col (99) han puesto de mani-

fiesto en 1976 que la conversión de MVA a escualeno y esteroides "in vivo" en el riñón, tiene lugar casi exclusivamente en los túbulos contorneados proximal y distal de la corteza. Los mismos autores (100) estudian el efecto del $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ sobre el metabolismo del MVA en riñón de rata, habida cuenta de que esta sal produce una necrosis aguda del túbulo proximal. La administración de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ 2-5 horas antes que la inyección de 5- ^{14}C -MVA produce una disminución del 16% en la incorporación de MVA en el riñón y un aumento del 63% en la incorporación de MVA en el hígado. Estos resultados pueden considerarse como la primera expresión bioquímica de mal funcionamiento de los túbulos renales, observable mucho antes que cualquier otra lesión estructural del riñón.

Ya en 1977 se ha estudiado también "in vivo", el significado cuantitativo del riñón en el metabolismo del MVA, comparando el destino del MVA sanguíneo en animales normales y nefrectomizados. Los resultados obtenidos por Wiley y col. (101) ponen de manifiesto, que el "shunt" representa un 26% del metabolismo del MVA en el animal intacto, mientras que la vía de los esteroides representa el 74% restante. Por otra parte, el riñón es el tejido en que mayoritariamente se metaboliza el MVA, tanto a esteroides y sus precursores como -sobre todo- a través del "shunt". En efecto, si bien en los animales nefrectomizados los tejidos extrarrenales pueden asumir el papel del riñón sintetizando esteroides, el "shunt" del MVA resulta disminuido en un 60%. Estos resultados, junto con los mencionados anteriormente, vuelven a señalar importancia del riñón como órgano especializado en el metabolismo del MVA.

1.4. - Importancia del cerebro en el metabolismo del MVA

El componente mayor de la fracción lipídica de la mielina es el colesterol (102, 103). El interés que tiene el metabolismo del ácido meválonico en el sistema nervioso central y por tanto en el cerebro surge de su actuación como precursor de la biosíntesis del colesterol. De hecho se ha estudiado la incorporación de MVA-2-¹⁴C a colesterol, así Chevallier y Gauthereon (104) vieron la importancia de las condiciones de administración del sustrato: intraperitoneal, intracisternal e intraventricular. Ramsey y col. (105, 106) han estudiado la formación de colesterol y otros esteroides por distintas fracciones subcelulares de cerebro de rata a partir de MVA, estableciendo comparaciones entre el proceso "in vivo" e "in vitro".

La distinción de experimentos hechos "in vivo" e "in vitro" es sobre todo necesaria al estudiar la incorporación del MVA a sustancias no esteroídicas. Edmond y Popjack (96) estudian la distribución de lípidos insaponificables y saponificables de los distintos tejidos de ratas de 9 días a las 4, 24 y 72 h después de inyectar subcutáneamente MVA-2-¹⁴C. Del total de la radiactividad del material insaponificable y saponificable, hasta el 33% era de fracción saponificable (ácidos grasos) obtenida de cerebro, espina dorsal y piel. De esta fracción a su vez el 90% se encontraba en el cerebro y espina dorsal, formada por palmítico y esteárico a las 4 h de la inyección.

Este "shunt" del MVA, como ya se señaló en el apartado anterior, solo ha podido ser demostrado por técnicas "in vivo" (96).

El palmítico y esteárico de lípidos del riñón y pulmón llegan a estar marcadas también pero no tan extensamente como en los tres órganos de origen ectodérmico, y los ácidos grasos del hígado no contenían ninguna radiactividad.

En estas experiencias se suele trabajar con animales recién nacidos porque es cuando comienza la mielinización y una intensa actividad sintética en el sistema nervioso central.

Finalmente, es necesario constatar que se ha demostrado la preferencia de el β -hidroxibutirato como sustrato para la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos en experiencias "in vivo" en las que se comparaban el β -hidroxibutirato-3- ^{14}C , aceto-acetato-3- ^{14}C , acetato-2- ^{14}C y mevalonato -2- ^{14}C (107) postulándose el papel que juegan los cuerpos cetónicos en el sistema nervioso central durante la mielinización, no solo como fuente de energía, sino también como sustrato que prestan su esqueleto carbonado a la biosíntesis de lípidos.

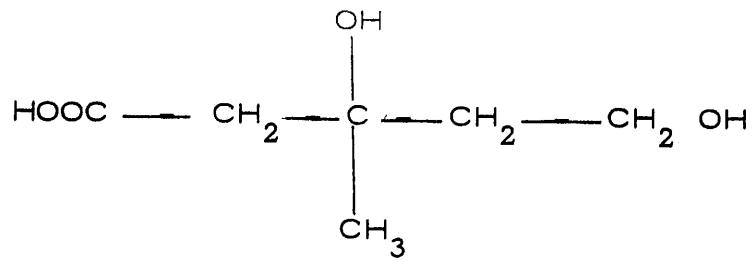
1.5. - Enzimas que catalizan la fosforilación del ácido mevalónico

El ácido mevalónico es convertido en isopentenil pirofosfato mediante tres reacciones (esquema nº 2). La primera de ellas es catalizada por la mevalonato cinasa y da lugar a la formación de P-MVA a partir de MVA. La segunda consiste en la transformación de P-MVA en PP-MVA catalizada por la fosfomevalonato cinasa. La tercera reacción para formar Ip-PP es la única descarboxilación que parece iniciarse por la fosforilación del grupo hidroxilo para suministrar un intermedio trifosforilado del MVA. Esta reacción está catalizada por la pirofosfomevalonato descarboxilasa. La diferencia entre las dos cinasas estriba en que la mevalonato cinasa cataliza la reacción irreversiblemente mientras que la reacción de la fosfomevalonato cinasa puede ser reversible en presencia de un exceso de ADP.

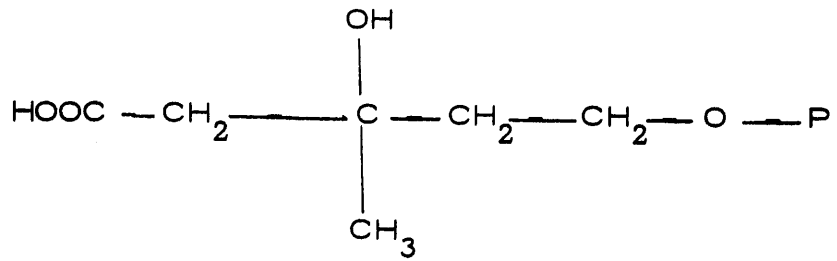
1.5.1. - Mevalonato cinasa

La mevalonato cinasa fue puesta de manifiesto por primera vez en autolisados de levadura (108) y en hígado de rata (109) y posteriormente demostrada en plantas superiores y microorganismos (110).

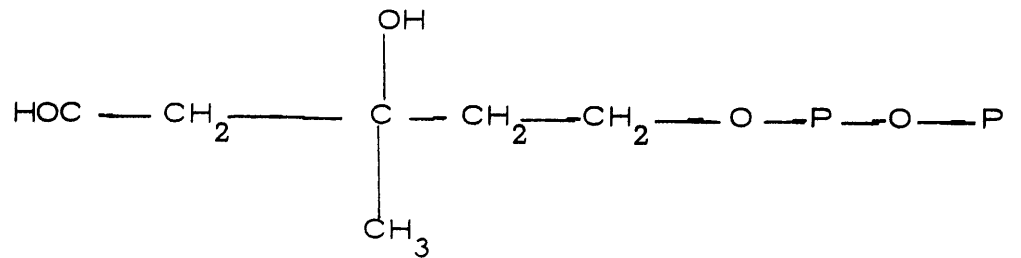
Mediante el empleo de mevalonato cinasa de hígado y ácido mevalónico R y S obtenidos sintéticamente como sustratos, se ha demostrado sin lugar a dudas que la enzima es estereoespecífica para el



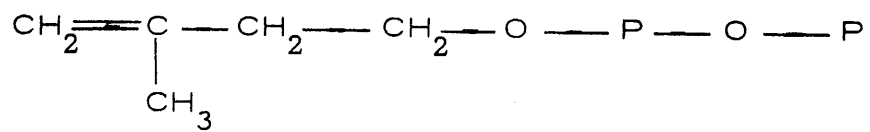
MVA



P-MVA



PP-MVA



Ip-PP

Esquema nº 2

enantiómero \underline{R} (111) y que el producto de la reacción es el \underline{R} mevalonato-5-fosfato levorotatorio (112).

La mevalonato cinasa de hígado de conejo fué purificada y estudiada por Markley y Sma Ilman (113) mediante las siguientes etapas: preparación de polvos acetónicos, precipitación con sulfato amónico, precipitación con sulfato de protamina y cromatografía en columna de DEAE celulosa. La enzima fué purificada unas 100 veces y conservada a -20°C conservaba la mitad de su actividad al cabo de un mes.

A partir de la enzima así purificada estos mismos autores observaron que la K_m para el MVA era $5.1. \times 10^{-3} \text{ M}$. El pH óptimo estaba comprendido entre 7.0-8.0. La actividad de la enzima disminuía mediante diálisis frente a agua destilada pero la actividad se conservaba si la diálisis era hecha frente a tampón fosfato y cisteína. La mevalonato cinasa de hígado de conejo requería ATP pero no podía ser sustituido por ADP, GTP, UTP, ó ITP. El Mn^{2+} podía sustituir al Mg^{2+} a bajas concentraciones mientras que el Zn^{2+} ó el Fe^{2+} no podían hacerlo a cualquier concentración. La cisteína también era necesaria para la actividad aunque podía ser sustituida por el β -ME.

El p-cloro mercuribenzoato inhibía casi totalmente la actividad enzimática; esta actividad podía ser restablecida añadiendo cisteína 1 minuto después que el inhibidor.

Estos mismos autores estudiaron la estequiometría de la reacción observando que a partir de una cantidad de MVA se formaban cantidades equivalentes de ADP y P-MVA.

Levy y Popjak (114) estudiando la mevalonato cinasa de hígado de cerdo, encontraron P-MVA y PP-MVA a partir de MVA y ATP. La fosfomevalonato cinasa, enzima que forma el PP-MVA, fué separada completamente de la mevalonato cinasa durante el proceso de purificación de esta última. Mediante precipitación con sulfato de protamina y sulfato amónico (30-45% de saturación) seguida de fraccionamiento con gel de fosfato cálcico, estos autores lograron purificar la enzima unas cien veces y estudiaron sus propiedades demostrando que es una enzima con grupos sulfhidrilos en su centro activo, dada su activación por cisteína en condiciones aeróbicas. La adición de p-cloro mercuribenzoato 1mM produce un 80% de inhibición de la mevalonato cinasa incluso en presencia de cisteína a igual molaridad, pero es revertida por cisteína 20 mM. La iodoacetamida no la inhibe a concentraciones 1 mM y 10 mM.

Los mismos autores estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de ATP como nucleótido coenzimático de la mevalonato cinasa. La concentración óptima de ATP depende de la concentración de iones Mg^{2+} en el medio de incubación. Así en presencia de Mg^{2+} 3mM, la concentración óptima aparente de ATP es de 5.5 mM mientras que con Mg^{2+} 5 mM, el ATP óptimo es 7.8 mM. Por otra parte la mevalonato cinasa de hígado de cerdo no es inhibida por concentraciones mayores a 8mM de ATP. La relación óptima ATP/Mg^{2+} fué de 1.5-2. Otros

nucleótidos (ADP, CTP, GTP, e ITP) fueron probados como posibles sustituyentes del ATP, a una concentración de 7.4 mM en presencia de Mg^{2+} 5 mM; solo el ITP pudo reemplazar al ATP formandose una cantidad de P-MVA casi idéntica a la lograda en presencia de ATP. En las experiencias realizadas con extractos crudos se añade FNa para inhibir la actividad adenosintrifosfatasa.

La mevalonato cinasa de hígado de cerdo requiere un ión metálico divalente para su activación. El ión Mg^{2+} muestra esta acción hasta una concentración de 4 mM a partir de la cual decrece en la misma. Los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , este último con menos efectividad, pueden sustituir al Mg^{2+} . El pH óptimo de la enzima se sitúa en 7.3 habiéndose ensayado entre los márgenes de 6.0-8.7. La especificidad de la enzima es muy estrecha ya que no puede fosforilar a varias sustancias relacionadas con el MVA; es activa solo frente a uno de los enantiómeros del DL-MVA. El farnesoato potásico y más concretamente la sal de su análogo saturado el 3,7,11 trimetildodecanoato inhiben la mevalonato cinasa de este origen.

Levy y Popjak han estudiado asimismo la influencia de la concentración de sustrato sobre la mevalonato cinasa de hígado de cerdo demostrando que la máxima velocidad se alcanza a concentración 2 mM de MVA calculando una constante de Michaelis aparente de 50 mM para el isómero natural.

Dorsey y Porter (115) purificaron la mevalonato cinasa de hígado de cerdo con gel de fosfato cálcico. Posteriormente someten la muestra a un fraccionamiento en columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón fosfato 0.01 M, pH 7.5. La mevalonato cinasa se eluye con tampón fosfato 0.1 M y es precipitada con sulfato amónico al 50% de saturación. El precipitado se disuelve en un volumen mínimo de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 y se dializa durante una noche frente a 500 volúmenes del mismo tampón. Posteriormente el dializado es fraccionado en columna de Sephadex G-200 equilibrada con el mismo tampón de la diálisis y eluida a una velocidad de 2 ml por hora. Esta preparación no contiene fosfomevalonato cinasa y es estable al menos durante seis semanas a 4°C.

Los mismos autores han demostrado que la mevalonato cinasa de hígado de cerdo es inhibida por geranil puro, fosfato y farnesil pirofosfato. Ambos ésteres fosfóricos a una concentración 2mM producen una inhibición del 50%. El hecho de que los precursores del farnesil pirofosfato, Ip-PP y DMAPP no la inhiban significativamente a la misma concentración, indica que la inhibición es completamente selectiva. Sin embargo a mayores concentraciones el Ip-PP (0.5mM) y el DMA-PP (0.59 mM) inhiben un 27% y 57% respectivamente. El pirofosfato inorgánico (0.1 mM) produce asimismo una inhibición del 28% sobre la mevalonato cinasa. Del hecho de que el farnesil no fuera inhibidor de la enzima (114) parece deducirse que la especificidad de la inhibición no depende de la fracción de pirofosfato ni de la fracción terpenil por separado, sino más bien de un terpenil pirofosfato de longitud de cadena definida. Estudios cinéticos sobre esta inhibición han demostrado que tanto el F-PP

como el G-PP inhiben incompetitivamente a la mevalonato cinasa cuando el sustrato variable es el MVA, mientras que lo hacen competitivamente cuando lo es el complejo $Mg-ATP^{2-}$. Estos datos, junto a los de Benedict y col (116) y Holloway y Popjak (117) sobre la síntesis del F-PP parecen indicar que las concentraciones de G-PP y F-PP que son usadas eficientemente por las enzimas específicas en la síntesis del colesterol, son también concentraciones que pueden ejercer una influencia reguladora sobre la actividad mevalonato cinasa. Sin embargo el significado "in vivo" de esta inhibición "feed-back" aún no se conoce.

En 1970 Flint (118) estudió la actividad y propiedades cinéticas de la mevalonato cinasa de ovario de ratas superovuladas, poniendo de manifiesto ciertas diferencias respecto a la misma enzima de hígado. El pH óptimo de la enzima de ovario está comprendido entre 7.0 y 7.5. La enzima requiere Mg^{2+} para su actividad, que permanece inalterada tras el tratamiento con hormona luteinizante "in vivo". La preparación parcialmente purificada tiene una constante de Michaelis para el D, L-MVA de 3.6 mM en presencia de $Mg-ATP^{2-}$ 2mM y una Km para el ATP de 120mM en presencia de D.L-MVA 1 mM. Estas constantes difieren de las mencionadas anteriormente para la enzima hepática (114) si bien la diferencia puede deberse a la utilización de preparaciones enzimáticas de distinto grado de purificación. Por otra parte, mientras que la enzima de hígado de cerdo y de rata activada por cisteína o glutatión, la de ovario de rata superovulada no es. En cambio en todos los casos tanto el geranil como el farnesil pirofosfato

actúan como inhibidores pero no el Ip-PP ni el DMA-PP. En el caso de la enzima de ovario, el fosfomevalonato actúa como un potente inhibidor de la propia enzima que cataliza su biosíntesis, la mevalonato cinasa.

Beytia y col (119) han purificado y estudiado el mecanismo de acción de la mevalonato cinasa de hígado de cerdo. El procedimiento seguido para la purificación es el de Dorsey y Porter (115) con algunas modificaciones. Consiste en una precipitación con sulfato amónico entre el 15-40 % de saturación del sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$ de un homogenado hepático hecho con tampón fosfato 0.1M, pH 7.5 con β -ME 10 mM EDTA 1 mM. El precipitado obtenido es dializado, tratado con gel de fosfato cálcico y precipitado de nuevo con sulfato amónico entre el 0-50% de saturación. Después se somete a cromatografía en columna de DEAE-celulosa, precipitación con sulfato amónico (0-60% de saturación) y filtración por gel de Sephadex G-200. La proteína enzimática eluida es absorbida de nuevo en columna de DEAE-celulosa, concentrada por precipitación con sulfato amónico (0-60% de saturación) y eluida en columna de Sephadex G-150. De esta manera se logra una purificación de unas 600 veces. La proteína enzimática es homogénea por electroforesis en gel de acrilamida, centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, electroenfoque y filtración por gel Sephadex.

La mevalonato cinasa de hígado de cerdo pierde un 70-80% de actividad cuando se conserva 10 días a 4°C en ausencia de β -ME o de DTT. Se obtiene una parcial recuperación de la actividad me-

diante incubación con DTT 10 mM durante 1 hora a 38°C. Cuando el β -ME se adiciona en todos los pasos de la purificación se mantiene la actividad durante un mes a 4°C sin pérdida significativa.

La enzima tiene un punto isoelectrico de 4.7 unidades de pH. Durante el proceso de electroenfoque hay un considerable cambio en la conformación de la proteína enzimática que se traduce en una elevada pérdida de la actividad enzimática debida probablemente al pH, ya que pierde también su actividad cuando se somete a diálisis en tampón acetato 5 mM pH 4.7 durante un mismo periodo de tiempo, si es sometida a una diálisis similar frente a un tampón pH 7.0.

De acuerdo con el comportamiento de la enzima frente al Sephadex G-100 se ha calculado un peso molecular aproximado de 98.000, mientras que por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa el peso molecular calculado es de 90.000.

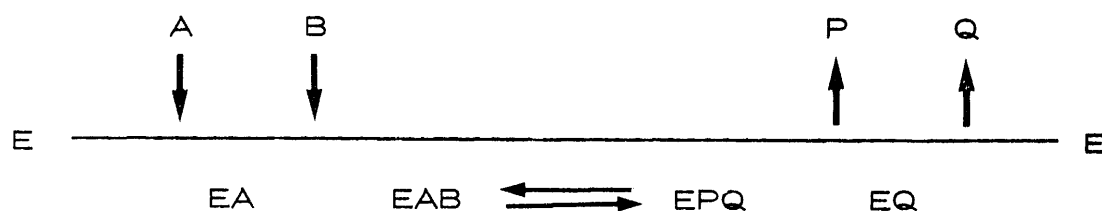
El análisis espectrofotométrico de la actividad mevalonato cinasa de hígado de cerdo ha puesto de manifiesto que la enzima requiere iones metálicos divalentes para su activación. A bajas concentraciones (1-10 mM) el Mn^{2+} es mejor activador que el Mg^{2+} lográndose la máxima actividad a 5 mM aproximadamente. A mayores concentraciones el Mn^{2+} es inhibidor. El Mg^{2+} actúa como mejor activador a concentraciones superiores. A concentraciones similares el Ca^{2+} no presenta capacidad activadora alguna.

Los inhibidores de grupos -SH como el p-hidroximercuribenzoato y la monoido acetamida inhiben la mevalonato cinasa de este origen. La inhibición puede ser revertida por adición de MVA ó de ATP a la mezcla de la incubación. Al contrario, al isopropil fosfluorhidrato que se une a los restos de serina no inhibe la mevalonato cinasa ni a una concentración 1 mM. De estos resultados puede deducirse que al menos un grupo-SH es esencial para la actividad de la enzima

Las constantes cinéticas de la enzima de hígado de cerdo son las siguientes: Km para el MVA, 1.86×10^{-5} M; Km para el $MgATP^{2-}$ 3.02×10^{-4} M. La constante de disociación para el MVA es 4.66×10^{-6} M. Cuando el P-MVA se encuentra presente en el medio de incubación se obtiene una inhibición no competitiva con el $MgATP^{2-}$ o el ATP como sustratos variables. Se observa casi una inhibición incompetitiva cuando la enzima está saturada con $MgATP^{2-}$. El ADP es un inhibidor competitivo de la mevalonato cinasa si el sustrato variable es el MVA.

A partir de una serie de estudios sobre la velocidad inicial de la reacción y sobre la inhibición por producto (P-MVA) y por metabolitos superiores Beytia y col. han llegado a la conclusión de que la fosforilación del MVA, catalizada por la mevalonato cinasa, es secuencial. Ya Dorsey y Porter (115) habían sugerido una actuación de este tipo teniendo en cuenta la inhibición por G-PP y F-PP; los estudios de Beytia lo han confirmado. Según este último todos los sustratos tienen que reaccionar con la enzima antes que el primer producto sea separado. El MVA reaccio-

na con la enzima en primer lugar seguido por el MgATP^{2-} y el orden de eliminación de los productos es primero el P-MVA y luego el ADP según el diagrama siguiente:



donde A y B son MVA y MgATP mientras que P y Q son P-MVA y ADP respectivamente.

Goodfellow Barnes (120) han aislado la mevalonato cina de larvas de mosca Sarcophaga bullata y han demostrado por primera vez la presencia de esta enzima en insectos.

En estos invertebrados se considera que no ocurre la biosíntesis de esteroides aunque parece que tiene lugar la de otros derivados isoprenoides como las ubiquinonas y hormonas juveniles. El procedimiento de aislamiento parte del sobrenadante de la centrifugación a $23.000 \times g$ durante 20 minutos de los homogenados obtenidos de larvas de Sarcophaga en tampón fosfato 0.1 M pH 7.1 conteniendo DTT 0.3 mM. Este sobrenadante se precipita con sulfato amónico entre el 30-60% de saturación, redisolto en el mismo tampón y dializado durante 4 horas frente a 40 volúmenes del tampón con EDTA 1.0 mM. El material dializado es precipitado con sulfato de protamina y el sobrenadante de nuevo precipitado con sulfato amónico entre el 35-55% de saturación. El precipitado es redisolto de nuevo y fraccionado en columna de Sephadex G-200 previamente equilibrada

con el tampón anterior y eluida con el mismo tampón. La fracción activa de mevalonato cinasa es aplicada a una columna de DEAE-Sephadex A-50 y eluida con un gradiente de ClK. El grado de purificación logrado al final del proceso es de 110 veces. La preparación es homogénea en electroforésis en gel de poliacrilamida.

La mevalonato cinasa así obtenida de larvas de Sarcophaga bullata tiene un peso molecular de 113.000 y una constante de Michaelis aparente para el MVA de 6.2×10^{-4} M y de 4.7×10^{-3} M para el ATP. La enzima muestra una activación óptima por Mn^{2+} a una concentración de 1.8 mM y por Mg^{2+} 7.1 mM. Concentraciones superiores de Mg^{2+} no afectan significativamente a la actividad de la enzima mientras que las concentraciones mayores que la óptima de Mn^{2+} son inhibitoras. A las concentraciones óptimas respectivamente la mevalonato cinasa es un 60% más activa en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . Aunque la enzima se caracteriza por una marcada preferencia por el ATP como nucleótido coenzimático, el ITP y el UTP pueden ser usados también a pequeña concentración (1.2 mM). El ITP no puede sustituir completamente al ATP. Por otra parte el ADP ensayado en un amplio margen de concentración no reemplaza los requerimientos en ATP si bien tampoco se ha demostrado ninguna inhibición en condiciones normales de inhibición. Asimismo tampoco se ha puesto de manifiesto la presencia en la fracción G-200 de la enzima de actividad nucleósido difosfato cinasa ya que no hay formación aparente de P-MVA en presencia de ADP y GTP ó CTP

La enzima de este origen no es sensible a la activación aeróbica por cisteína o glutatión pero es inhibida por p-cloro-mercuribenzoato, N-etil maleimida y iodoacetamida, inhibición que es de diferente amplitud de acuerdo con el inhibidor y la concentración ensayadas. El pH óptimo observado es de 7.2.

Barnes y Goodfellow (121) han estudiado también la localización y la variación de la actividad mevalonato cinasa durante el desarrollo de las larvas de Sarcophaga bullata así como el efecto de los esteroides de la dieta sobre la enzima de este origen (122) y la influencia de la presencia o ausencia de gérmenes en el medio de cultivo.

Slakey y col. (21) han estudiado los efectos del ayuno, la realimentación y el ritmo diurno sobre la mevalonato cinasa de hígado de rata dentro del conjunto de enzimas que catalizan la conversión de 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA a escualeno.

Estos autores han encontrado que la mevalonato cinasa no varía la actividad durante el ayuno ni con la realimentación a las 72 horas de haber comenzado el ayuno. Tampoco exhibe ritmo diurno después de la realimentación.

Si bien Dorsey y Porter (115) habían estudiado la inhibición de la mevalonato cinasa de hígado de cerdo por F-PP y G-PP, esta inhibición no parece probable que sea la causa de la inhibición de la síntesis de colesterol a partir de MVA (21) ya que Slakey y col. han observado que la síntesis de F-PP se incrementa durante la realimentación y

la recuperación observada en la conversión de MVA a escualeno después de la realimentación, es más rápida que la observada en la actividad dimetilalil transferasa.

Más adelante Slakey y col. (11) investigaron las enzimas que convierten el acetil CoA en escualeno en aorta de cerdo estudiando en conjunto la conversión de ácido mevalónico en isopentenil pirofosfato con el P-MVA, PP-MVA como metabolitos intermedios usando extractos procedentes de la precipitación con sulfato amónico entre 15-60 % de saturación.

Estudiaron este proceso añadiendo al sistema de incubación FK para inhibir las fosfatasas y iodoacetamida para inhibir la isopentenil pirofosfato isomerasa.

La formación de fosfomevalónico por este sistema enzimático aumenta al 100 % cuando se suprime la adición de FK lo que está de acuerdo con los resultados de Rodríguez y Leal (26) que encontraron que la conversión de ácido mevalónico en colesterol se inhibía por la presencia de FK.

Ramachandran y Shah (6) han estudiado la fosforilación del ácido mevalónico y su posterior descarboxilación en hígado de ratas lactantes y destetadas. La formación de P-MVA es igual en ambos casos, mientras que la formación de Ip-PP es de 5-20 veces mayor en ratas destetadas. También han estudiado el efecto de la alimentación con una dieta con 1 % de colesterol encontrando que la formación de P-MVA no varía mientras que la síntesis de Ip-PP disminuye un 50-80 %, deduciendo de estos datos que la descarboxilación de PP-MVA es un punto de control en la síntesis del colesterol.

En microorganismos Ohnoki y col (123) han estudiado la biosíntesis del fitoeno en Staphylococcus identificando el P-MVA como primer producto del metabolismo del MVA y aislando la mevalonato cinasa de este origen. La identificación del P-MVA la hacen por radiocromatografía en papel empleando diferentes líquidos de desarrollo dada la variabilidad de los valores Rf observados. La mevalonato cinasa de Staphylococcus requiere ATP y Mn^{2+} para su actuación. La enzima conserva su actividad durante varias semanas si se mantiene congelada.

Cooper y Benedict (110) han estudiado la mevalonato cinasa de Euglena gracilis encontrando que es necesario la presencia de ATP y Mg^{2+} para la actividad de la enzima así como el glutatión, aunque la ausencia de este último solo disminuye la actividad mevalonato cinasa un 40% aproximadamente. Estos autores estudiaron asimismo la influencia del tiempo de incubación y de la concentración de proteínas sobre la actividad de la enzima. La constante de Michaelis aparente para el DL-MVA es 6×10^{-5} M y para el ATP de 6×10^{-3} M. La enzima es drásticamente inhibida por concentraciones de ATP superiores a 15 μ moles/ml. Esto puede ser debido a que a estas concentraciones de ATP la relación ATP/Mg^{2+} excede de la unidad.

Los mismos autores no han podido detectar mevalonato cinasa en algas verdes-azuladas y bacterias fotosintéticas, lo cual puede estar en relación con el hecho de que estos microorganismos solo contienen carotenos, mientras que la actividad mevalonato cinasa si es observable en organismos que contienen esteroides y carotenos como las plantas superiores.

Green y Baisted (124) han descrito un método para la determinación de la mevalonato cinasa de semillas de Pisum sativum.

La preparación enzimática consiste en el sobrenadante de la centrifugación a 40.000 g de un extracto crudo de semillas de guisante obtenido en tampón fosfato 0.1 M pH 6.8 conteniendo Mg^{2+} 0.01 M, glutatión 0.01 M y sacarosa 0.45M. La determinación de la actividad se basa en la desaparición de MVA- $2^{14}C$ con condiciones en que la cinética es de primer orden respecto al sustrato. El MVA residual es separado mediante una modificación de la técnica de Porter para el aislamiento de la mevalonato lactona (125). Por otra parte los derivados fosforilados del MVA fueron separados e indentificados mediante cromatografía en DEAE-celulosa (126) y posterior cromatografía en papel, cromatografía en columna de Dowex-formiato (127) o por hidrólisis ácida y evaporación de los componentes volátiles para la determinación de derivados alílicos (128). Mediante estos métodos demostraron que la distribución de la radioactividad al final de la reacción para la siguiente: MVA (68%), P-MVA (6-7%) PP-MVA (9-10%), Ip-PP (4-5%) DMA-PP (11%) e Ip-P (1%) . No fué puesto de manifiesto ningún alilpirofosfato ni fostato superior al DMA-PP.

Más recientemente Green y Baisted (129) han estudiado las actividades enzimáticas implicadas en la conversión de ácido mevalónico en escualeno durante las primeras etapas de la germinación de semillas de Pisum sativum y han encontrado que en términos absolutos la mevalonato cinasa es la más activa de las enzimas del metabolismo isoprenoide. Estos

autores han demostrado que la actividad mevalonato cinasa es máxima a los cuatro horas de germinación, disminuyendo ligeramente con posterioridad sin que exista dilución con otras proteínas inactivas. El pH óptimo de la mevalonato cinasa es de 7.3.

En el latex de Hevea brasiliensis, Williamson y Kekwick (130) pusieron de manifiesto la formación de P-MVA a partir de MVA por la mevalonato cinasa, en un primer trabajo sobre las enzimas que participan en la biosíntesis del caucho.

La purificación de la enzima la llevan a cabo precipitando en primer lugar a pH 4.5 con lo que eliminan gran cantidad de proteínas acompañantes. La precipitación con sulfato amónico o con disolventes orgánicos como el etanol o la acetona no produjo aumento alguno de la actividad específica. El sobrenadante de la precipitación ácida dializado frente a tampón fosfato 0.02 M pH 6.0 es aplicado a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con este tampón; muy poca proteína y ninguna actividad mevalonato cinasa es eluida con un gradiente de ClK hasta una concentración 1.0M. Similares resultados se encontraron en experimentos paralelos realizados a pH 7.5. Aunque la absorción en gel de fosfato cálcico había sido utilizada con éxito en la purificación del enzima de hígado de cerdo (114), la enzima de Hevea presente en el sobrenadante ácido no puede ser eluida con éxito de las columnas de hidroxilapatito. Sin embargo se obtienen buenos rendimientos cuando el sobrenadante de la precipitación a pH 4.5 es aplicado a una columna de Sephadex G-200 en tampón fosfato 0.05 M pH 7.5. La elución con este tampón originó una fracción activa en la que estaba contenida en 91 % de la proteína aplicada.

Experimentos llevados a cabo en columna de DEAE-Sephadex A-50 demostraron que alrededor del 95% de la actividad enzimática podía eluirse con solución de ClK en un gradiente de concentración. A continuación la enzima fue concentrada por ultrafiltración, dializada y aplicada a una segunda columna de DEAE-Sephadex A-50 a pH 6.0. de esta manera se consiguió una purificación de unas 160 veces. El examen cromatográfico solo demuestra la existencia de P-MVA pero no de PP-MVA: lo cual sugiere la ausencia de fosfovalonato cinasa en el purificado.

Las propiedades de la mevalonato cinasa de Hevea fueron estudiadas por Williamson y Kekwick utilizando el primer eluido de la columna de DEAE-Sephadex A-50. La K_m para el MVA resultó ser 0.13 mM y para el ATP 2 mM. En cuanto a la especificidad de los nucleótidos, el ITP es tan activo como el ATP a similares concentraciones y el único nucleótido activo fue el UTP si bien con una menor efectividad. Los nucleótidos CTP y GTP eran inactivos. Tampoco puede utilizarse el ADP como agente fosforilante. Empleando como preparaciones enzimáticas el suero de latex reconstituido demostraron que la mevalonato cinasa era activada por Mg^{2+} y Mn^{2+} siendo el Mn^{2+} 1mM el que produce la máxima activación en presencia de ATP 6 mM. El Mg^{2+} produce una activación menor que el Mn^{2+} alcanzándose su máximo a concentración 4 mM. A concentraciones superiores a las consideradas anteriormente como óptimas, ambos iones producen inhibición siendo ésta más pronunciada con el Mn^{2+} . De los restantes iones ensayados solo el Ca^{2+} produce una ligera activación; el Co^{2+} , Fe^{2+} y Ba^{2+} no tenían prácticamente ningún efecto. El pH óptimo fue de 7.5 si bien la enzima era estable durante 1 hora a 30°C en un margen de

pH comprendido entre 4.5 y 9.0. La mevalonato cinasa de Hevea no es activada por cisteína ó glutati3n al contrario que la enzima de h3gado de cerdo. Sin embargo la enzima es sensible a los reactivos bloqueantes de grupos -SH: la N-etil maleimida a una concentraci3n 10 mM produce un 100% de inhibici3n, mientras que la iodoacetamida a la misma concentraci3n solo produce una inhibici3n del 15 %. Los iones Zn^{2+} (10 mM) producen una inhibici3n del 96%.

Posteriormente Chesterton y Kekwick (131) han investigado la formaci3n de Ip-P e Ip-PP a partir de MVA en Hevea brasiliensis observando que el producto inicialmente formado era el P-MVA.

La formaci3n de derivados fosforilados del MVA en pino fu3 puesta de manifiesto por Valenzuela y col. (132). Las ac3culas aisladas de Pinus radiata incorporan la radiactividad del ortofosfato en ATP, PP-MVA el Ip-PP mientras que la radiactividad del MVA aparece en 3stos dos 3ltimos compuestos y en P-MVA cuando se utiliza como material enzim3tico un extracto libre de c3lulas de pl3ntulas del mismo origen. Estos extractos contienen una fosfatasa muy rica que rompe el ATP, el ADP y varios fosfomono3steres. La adici3n de FNa 0.03 M inhibe la actuaci3n de la fosfatasa permitiendo el ac3mulo de derivados fosforilados especialmente de los alil pirofosfatos. La peque1a cantidad de PP-MVA puesta de manifiesto por estos autores, puede deberse a una r3pida descarboxilaci3n a Ip-PP en comparaci3n con una m3s lenta fosforilaci3n del P-MVA.

En estudios posteriores, Valenzuela y col. (133) pudieron demostrar la presencia de mevalonato cinasa en extractos libres de células de plántulas de Pinus radiata. La enzima está presente en la fracción acuosa puesto que la centrifugación a $34.000\times g$ ó a $170.000\times g$ durante 2 horas no afecta a la actividad del líquido sobrenadante. La enzima puede ser concentrada con sulfato amónico al 55% de saturación si bien con ello no se logra ningún incremento de la actividad específica. La máxima actividad se logra con tampón Tris- maleato pH 6.0; la adición de Mn^{2+} 3mM con ATP 23.5 mM produce un máximo de actividad la cual disminuye fuertemente al aumentar la concentración de ión metálico. El EDTA produce una inhibición casi total. Este comportamiento es muy parecido al de la enzima de Hevea y la de hígado. Cuando la enzima se estudia en diferentes periodos de tiempo de incubación la cantidad máxima incorporada es solo del 50% incluso al cabo de 4 horas lo cual parece demostrar la especificidad de la enzima hacia un enantiómero del MVA.

Trabajando con extractos libres de células de P. radiata Beytia y col (134) observaron que alrededor del 1% de la radiactividad del MVA quedaba retenida en las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético. Este fenómeno requería por otra parte la presencia de ATP, iones Mn^{2+} y grupos -SH libres y tenía lugar asimismo mediante precipitación con sulfato amónico al 80% de saturación. La interpretación más lógica consiste en el establecimiento de una unión no covalente a algunos intermediarios biosintéticos superiores ya que el n-butanol extrae el 92% de la radiactividad del precipitado correspondiente principalmente a los prenoles de 15 átomos de carbono.

En Pinus pinaster García Peregrín (135) demostró la incorporación del MVA a derivados fosforilados por plántulas de 20-100 días en presencia de ATP 8 mM, Mg^{2+} 4 mM y Mn^{2+} 4mM. Asimismo (136) estudió la influencia de algunos efectores de grupos -SH sobre el comportamiento de las enzimas fosforilantes del MVA en extractos libres de célula de P. pinaster. El glutati6n tiene un efecto marcadamente favorable sobre la formaci6n de P-MVA as6 como sobre la formaci6n de PP-MVA e Ip-PP especialmente cuando actua a concentraci6n 10 mM y algo menos fuerte a concentraci6n 1 mM. Un efecto similar aunque menos acusado presenta ciste6na. Entre los compuestos que bloquean los grupos -SH, Garc6a Peregr6n estudi6 el efecto de la iodoacetamida, p-hidroximercuribenzoato y etilmaleimida. La iodoacetamida 10 mM inhibe casi completamente a la mevalonato cinasa mientras que a una concentraci6n de 1 mM la inhibici6n es mucho menor. El glutati6n, adicionado a una concentraci6n 1.6 mM, contrarresta la inhibici6n producida por la iodoacetamida 1 mM y reduce bastante el efecto de la iodoacetamida 10 mM. El p-hidroximercuribenzoato presenta un d6bil efecto a una concentraci6n 0.01 mM pero produce una completa inhibici6n de las enzimas estudiadas cuando actua a una concentraci6n 1 mM. La presencia de glutati6n 1.6 mM no evita esta inhibici6n pero s6 la ejercida por el p-hidroximercuribenzoato a 0.01 mM. La etilmaleimida es algo menos efectiva a concentraci6n 0.01 mM, pero tambi6n inhibe completamente a la mevalonato cinasa a concentraci6n 1 mM. Esta inhibici6n es contrarrestada por la presencia de glutati6n 1.6 mM.

Suarez (137) demostr6 que los extractos obtenidos a partir de polvos acet6nicos de semillas de Pinus pinaster conservan la actividad mevalonato cinasa durante varias semanas a 4°C. El pH 6ptimo

de la enzima fué de 7.8-8 que difiere del de la mevalonato cinasa de P. radiata (133) siendo similar a los de hígado de cerdo (114), ovario de rata superovulado (118) , latex de Hevea (130) y larvas de S. bullata (120).

El ATP fué el nucleótido más efectivo pára fosforilar el MVA en extractos libres de células de semillas de P. pinaster; no así el ADP, GTP, UTP e ITP a las mismas concentraciones.

Tampoco se encontró actividad nucleótido difosfato cinasa puesto que el GTP, UTP e ITP fueron incapaces de formar P-MVA a partir de MVA en presencia de ADP. La mevalonato cinasa de este mismo origen fué capaz de fosforilar el MVA incluso en ausencia de ión metálico divalente. La adición de Mn^{2+} 10 mM produce una inhibición de un 50% en la enzima mientras que el Mg^{2+} a la misma concentración produce solo una pequeña inhibición. La adición de EDTA 10 mM produce una completa inhibición en la enzima. Cuando los extractos dializados durante 30 min. 1 h ó 2 h, se redujo fuertemente la capacidad de la mevalonato cinasa para fosforilar el MVA mientras que la adición de Mg^{2+} 5-10 mM incrementó ligeramente la formación de P-MVA. Resultados similares se encontraron usando extractos de polvos acetónicos.

La Km de la mevalonato cinasa de P. pinaster para el MVA fué de 8×10^{-5} M para ATP 8 mM y la Km para el ATP 1.4×10^{-4} M para MVA 5.7×10^{-5} M.

La mevalonato cinasa de este origen fué parcialmente purificada partiendo del extracto del polvos acetónicos seguida de una precipitación con sulfato de protamina en la que apenas se obtuvo purificación

al contrario que con la enzima de hígado de cerdo (114). Alrededor del 80% de la enzima fué precipitada con sulfato amónico entre 30-45% de saturación. Este precipitado redisolto fué eluido en una columna de Sephadex G-1000 obteniéndose dos fracciones con actividad mevalonato cinasa (138) la segunda de las cuales perdía rápidamente la actividad. La primera fracción activa fué inyectada en una columna de DEAE-Sephadex A-50 no obteniéndose incremento de la actividad específica.

La mevalonato cinasa de extractos obtenidos a partir de polvos acetónicos de Agave americana es activada por glutatión o por β -mercapto-etanol 10 mM lográndose un fuerte incremento de la formación de P-MVA cuando el β -mercaptoetanol es adicionado al tampón para la preparación del extracto, actuando en este caso como protector de la enzima durante todo el proceso de manipulación e incubación (139).

Otras características de la mevalonato cinasa de Agave americana han sido estudiadas por Suarez (140). Como en la enzima de P. pinaster el ATP fué el dador de fosfato más efectivo a concentración 1 mM y 5 mM, no pudiendo ser suplantado por el ITP, GTP ó UTP a las mismas concentraciones. El pH óptimo resultó ser 7.9.

Asimismo la mevalonato cinasa de extractos obtenidos de polvos acetónicos de hojas de A. americana fué capaz de formar P-MVA a partir de MVA en ausencia de los iones metálicos divalentes. La adición de Mg^{2+} 10 mM aumenta fuertemente la fosforilación del MVA mientras que el Mn^{2+} a la misma concentración produce inhibición. El mismo efecto se observó con extractos dializados.

La mevalonato cinasa del mismo origen parcialmente purificada alcanzó su máximo de actividad en presencia de Mn^{2+} 2 mM o de 6-8 mM de Mg^{2+} . Concentraciones más altas de Mn^{2+} inhiben fuertemente la actividad de la enzima mientras que mayores concentraciones que las óptimas de Mg^{2+} solo producen una ligera inhibición.

La K_m de la mevalonato cinasa de extractos de polvos acetónicos de hojas de A. americana fué 0.05 mM para el MVA en presencia de una concentración de ATP 8 mM mientras que la K_m para el ATP fué 0.14 mM con una concentración de MVA 0.057 mM.

La mevalonato cinasa de este mismo origen fué parcialmente purificada a partir de polvos acetónicos de hojas. Estos extractos fueron precipitados con sulfato amónico entre 30-45 % de saturación. La posterior elución en una columna de Sphadex G 100 dió dos fracciones activas (138) y al igual que en P. pinaster (137) la segunda fracción perdió rápidamente la actividad mevalonato cinasa. La primera fracción activa fué eluida en una columna de DEAE-Sephadex A-50 y a continuación de nuevo por una columna de Sephadex G-100. En experiencias paralelas la primera fracción activa de la columna de Sphadex G-100 fué aplicada a una columna de DEAE-celulosa no obteniéndose aumento apreciable de la actividad específica de la mevalonato cinasa.

La formación de P-MVA por extractos libres de células de batatas inyectadas con la podredumbre negra (Ceratosis fimbriata) ha sido demostrada por Oshima-Oba y Uritani (141) a partir de $MVA-^{14}C$. Tanto

la mevalonato cinasa como las otras enzimas implicadas en la biosíntesis del Ip-PP necesitan la presencia de iones Mg^{2+} para su actuación alcanzándose un óptimo en la producción de Ip-PP en presencia de Mg^{2+} 5 mM. La actividad de los sistemas enzimáticos estudiados es mayor en tejidos infectados por el hongo que en los sanos o en los cortes de tubérculos.

Potty y Bruemmer (142) han puesto de manifiesto la existencia de las enzimas que fosforilan el MVA en las vesículas de zumo de fruto de la naranja mediante la identificación de P-MVA y PP-MVA como productos de la reacción. Estos dos derivados fosforilados fueron los únicos observados. La adición de una polivinilpirrolidona (Polycar AT) y de ascorbato sódico al medio de extracción produjo preparaciones enzimáticas con actividades específicas superiores. El extracto así obtenido es precipitado con sulfato amónico al 90 % de saturación suspendido en tampón Tris 0.1 M pH 7.0 y dializado frente a agua destilada a 4°C durante 2 horas. El tratamiento de la solución dializada con resinas tipo Dowex incrementó la actividad específica de la preparación.

La máxima incorporación de MVA por estas preparaciones de naranja ocurre a las 3 horas disminuyendo posteriormente la cantidad de derivados fosforilados del MVA formados. Esta disminución es debida probablemente a la fosfatasa presente en el extracto. A las 3 horas, la actividad de la fosfatasa es superior a la de la mevalonato cinasa. Por otra parte la máxima fosforilación del MVA tiene lugar a pH 6.5. La concentración óptima de ATP es 7.5 mM en presencia de Mg^{2+} 10 mM; niveles superiores de ATP producen una ligera inhibición de la mevalonato cinasa posiblemente por captación de los iones Mg^{2+} . La reacción es específica para el

ATP; el UTP ó el CTP no pueden reemplazarlo como nucleótidos fosforilantes. La mevalonato cinasa de naranja requiere agentes reductores para su máxima actividad específica como se pone de manifiesto por el incremento de la actividad observada en presencia de glutatión, mercaptoetanol y ditioneitol. La inhibición por iodoacetamida sugiere que al menos un grupo tiólico de la enzima puede participar en el centro activo. El FK incrementa la cantidad de derivados fosforilados del MVA presentes en el medio, posiblemente a través de la inhibición de la fosfatasa que los hidrolizaba.

Gray y Kekwick (143) han estudiado la inhibición de la mevalonato cinasa de Hevea brasiliensis, Cucumis melo, Phaseolus vulgaris y Saccharomyces cerevisiae por geranyl pirofosfato, farnesil pirofosfato, geranylgeranyl pirofosfato y fitil pirofosfato. La enzima de Hevea fué purificada por el método de Williamson y col (130), la de Phaseolus por el de Gray y col (144) y la de levadura, según Tchen (108). Para la purificación de la mevalonato cinasa de cotiledones de Cucumis melo se preparó una suspensión en tampón fosfato 0.08 M y pH 7.0 y se centrifugó a $105.000 \times g$ durante 60 minutos a 2°C. Las proteínas inactivas se precipitaron a pH 5.6 con ácido acético 2 M y el sobrenadante, constituido por las proteínas activas, fué precipitado con sulfato amónico hasta el 60 % de saturación. La enzima del precipitado se purificó posteriormente por filtración a través de una columna de Sphadex G-200 eluyendo con tampón fosfato 0.08 M pH 7.0.

El efecto inhibitorio de los cuatro prenil pirofosfatos mencionados fué estudiado espectrofotométricamente demostrándose que el fitilpirofosfato era el inhibidor más potente de la enzima de Hevea y Phaseolus mientras que el farnesil pirofosfato lo era sobre los dos Saccharomyces y

Cucumis. Las inhibiciones mayores se lograron con una concentración de inhibidor de 0.25 M. Las cinéticas de las inhibiciones, tanto en presencia de MVA como de ATP como sustratos variables pusieron de manifiesto que la inhibición es incompetitiva respecto al MVA y competitiva respecto al Mg-ATP^{2--} , calculandose asimismo la K_m y K_i de los cuatro inhibidores estudiados.

Más recientemente Gray y Kekwick (145) han estudiado los pesos moleculares, coeficientes de difusión y de sedimentación de la mevalonato cinasa de Hevea brasiliensis, Cucumis melo, Phaseolus vulgaris, Saccharomyces cerevisiae hígado de pollo e hígado de conejo, mediante filtración por gel en Sphadex G-100, Sephadex G-200 y centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa encontrando que la enzima tiene similares pesos moleculares (94.800-103.500), coeficientes de difusión ($5.39-5.62 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$) y coeficientes de sedimentación (5.85-6.00 S) en las seis preparaciones estudiadas.

Thomas y Stobart (146) han puesto de manifiesto la fosforilación del MVA en cultivos de Kalanchoe crenata demostrando un incremento de la actividad mevalonato cinasa de cloroplastos cuando el cultivo es iluminado después de un periodo de oscuridad.

Hill y Rogers (147) han estudiado la mevalonato cinasa de hojas, cotiledones y cloroplastos de Phaseolus vulgaris. El pH óptimo de la enzima fué 7.5. aunque a pH 5.5 los extractos de hojas y cotiledones tenían una apreciable actividad mevalonato cinasa, no así los cloroplastos en los que a este último pH la actividad era muy pequeña. Esto puede ser de-

bido a que los tampones usados no contenían fosfato inorgánico, la presencia del cual reduce la actividad fosfatasa. La mevalonato cinasa de este origen era estable durante largos periodos de tiempo conservada a 4°C tanto a pH 5.5 como a pH 7.5. Sin embargo al primer pH la enzima decrece su actividad alrededor del quinto día lo cual coincide con un aumento de la actividad fosfatasa en el mismo periodo y al mismo pH.

El p-cloro mercuribenzoato inhibía casi completamente la actividad mevalonato cinasa de cotiledones de Phaleolus a una concentración 0.1 mM. La iodoacetamida era mucho menos efectiva y una concentración 10 mM inhibía un 20 % a pH 5.5 mientras que practicamente no afectaba a pH 7.5. En todos estos casos la adición de un exceso de β -mercapto-etanol disminuía fuertemente esta inhibición.

La actividad mevalonato cinasa de cotiledones era aumentada mucho más fuertemente por Mg^{2+} 5 mM que por Mn^{2+} a la misma concentración. Asimismo fué estudiada la inhibición de la mevalonato cinasa por distintos intermedios terpenoides como el farnesil, geranil y por esteroides como el escualeno, lanosterol y sitosterol.

En hojas de Nepeta cataria Downing y Mitchell (148) han encontrado que el pH óptimo de la mevalonato cinasa es 7.0 estudiando también el tiempo óptimo de la reacción que es 90 min. Asimismo Downing y Mitchell (149) han estudiado la mevalonato cinasa de hojas y "callus" de Nepeta cataria encontrando en aquellos una mayor actividad mevalonato cinasa al contrario que en el "callus". La adición de iodoacetamida 5 mM aumenta la actividad mevalonato cinasa al impedir la formación de los prenil pirofosfato que inhibirían a la enzima.

En hígado de pollo Garcia - Martínez (93) estudia la fosforilación del ácido mevalónico en los primeros días del desarrollo y observa una clara diferencia en la curva de actividad pH entre la formación de fosfomevalónico y pirofosfomevalónico. La cantidad de fosfomevalónico formado es muy similar a pH 7.5 y 9.5 sin embargo el pirofosfomevalónico muestra un máximo a pH 9.5. La fosforilación del ácido mevalónico durante el desarrollo en los primeros días de vida del pollo no muestra una diferencia significativa entre el primer y sexto día después de la eclosión pero sí observan un incremento significativo en la cantidad de fosfomevalonato formado después del séptimo día después de la eclosión.

En 1977 se estudia por primera vez en algas Clorofíceas la incorporación de ácido mevalónico a derivados fosforilados (150) Utilizando como preparaciones enzimáticas extractos libres de células de suspensiones de Chlorella fusca. Se observó que el máximo de fosforilación total del ácido mevalónico se lleva a cabo a un pH de 8.2. Se estudió la fosforilación del ácido mevalónico en un tiempo de incubación entre cero y 120 minutos, observando que decrece la cantidad de pirofosfomevalónico formado cuando el tiempo de incubación pasa de 30 minutos. La actividad de las enzimas fosforilantes es inhibida por altas concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} . En todas las condiciones ensayadas se observa más cantidad de pirofosfomevalónico que de fosfomevalónico.

Ramachandran (6) ha estudiado las propiedades de la mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa en el sobrenadante de 105.00 x g de cerebro de rata y los cambios de actividad a lo largo del desarrollo. Los tres enzimas necesitan para su

actividad óptima la suplementación de ATP. La presencia de Mg^{2+} como catión divalente también es necesaria para la actividad óptima de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa el Mg^{2+} y el Mn^{2+} son igualmente efectivos para la pirofosfomevalonato descarboxilasa. El rango de pH óptimo para ambas enzimas es de 6.5–8.0 mientras que para la fosfomevalonato descarboxilasa es aproximadamente 6. No hay cambios de actividad dependientes de la edad para la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa mientras que la pirofosfomevalonato descarboxilasa incrementa su actividad durante la primera semana después del nacimiento y baja después del octavo día. La K_m de la mevalonato cinasa de cerebro es 312, 400 y 434 mM a los 2, 13 y 52 días de edad respectivamente.

1. 5. 2. – Fosfomevalonato cinasa

La formación de PP-MVA a partir de P-MVA en presencia de la enzima fosfomevalonato cinasa fué puesta de manifiesto por Henning y col. (151) en autolisados de levadura a partir de donde purificaron parcialmente la enzima y estudiaron algunas de sus características. La principal diferencia respecto a la mevalonato cinasa estriba en que la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa puede hacerse reversible por adición de un exceso de ADP. Los iones Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} activan a la enzima purificada unas 50 veces, la cual, a su vez presenta un amplio margen de actividad máxima entre los pH 5.5–10.0 (152).

En hígado de cerdo Helling y Popjak (153) han purificado la fosfomevalonato cinasa poniendo de manifiesto asimismo la reversibilidad de la reacción por ella catalizada. La enzima tiene un pH óptimo de 7.3 en presencia de Mg^{2+} .

Slakey y col (21) han estudiado la fosfomevalonato cinasa de hígado de rata. En estas experiencias los animales eran sometidos a ayuno seguido de una realimentación. En estas condiciones la actividad fosfomevalonato cinasa no se alteró significativamente no mostrando tampoco ritmo diurno.

En homogenados de aorta de cerdo Slakey y col. (11) después de precipitar el sobrenadante de la centrifugación a 105.000g con sulfato amónico entre el 15-60% de saturación observaron la formación de PP-MVA a partir de MVA. La presencia de fosfatasas activas hizo que la cantidad de PP-MVA formado en ausencia de FK fuese ligeramente menor que la observada en presencia de FK, inhibidor de las fosfatasas.

Recientemente Ramachandra y Sah (6) han estudiado la formación de Ip-PP a partir de MVA en hígado de ratas lactantes y destetadas, la cantidad de PP-MVA formado en ratas destetadas aumenta casi un 100% respecto al formado por ratas lactantes obteniéndose valores similares en ratas alimentadas con una dieta suplementada con 1 % de colesterol que en ratas alimentadas con una dieta normal.

Esta diferencia de la actividad de fosfomevalonato cinasa en ratas lactantes y destetadas pudiera sugerir según los autores que esta enzima es limitante en la formación de $ip\text{-PP}$ aunque el hecho de que la enzima sea reversible (153) hace pensar que las reducidas cantidades de $PP\text{-MVA}$ formadas en ratas lactantes no refleja necesariamente la baja actividad de la fosfomevalonato cinasa.

Aunque durante la biosíntesis del $Ip\text{-PP}$ por el latex de Hevea brasiliensis se acumula muy poca cantidad de $PP\text{-MVA}$ Skilleter y col (154) han puesto de manifiesto en el suero del latex reconstituido la presencia de la fosfomevalonato cinasa en presencia de ATP. El suero reconstituido fué dializado frente a tampón fosfato 50 mM pH 7.0 conteniendo Mg^{2+} 5 mM y N-acetil cisteína 4 mM y posteriormente aplicado a una columna de Sephadex G-200 y eluido con el mismo tampón. La fracción protéica activa fué concentrada por diálisis a presión y aplicada a una nueva columna de DEAE-Sephadex. Se obtuvo así fosfomevalonato cinasa libre de pirofosfomevalonato descarboxilasa que la impurificaba. La enzima era muy inestable y su pH óptimo estaba comprendido entre 7.0 y 7.5. Asimismo perdía su actividad cuando se eliminaban los iones Mg^{2+} ó Mn^{2+} y los compuestos protectores de grupos tiólicos. La actividad óptima se logra en presencia de Mg^{2+} 8 mM actividad que es unas 2.5 veces mayor que la alcanzada en presencia de la concentración óptima de Mn^{2+} (3mM). Los valores de las K_m fueron 0.04mM para el $P\text{-MVA}$ y 0.14 mM para el ATP incrementándose ambas al aumentar la temperatura hasta los 40°C.

La estequiometría de la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa de latex de Hevea brasiliensis ha sido estudiada por Skilleter y Kekwick (155) los cuales han demostrado que el PP-MVA y el ADP se forman en cantidades equimoleculares. Varios iones metálicos divalentes pueden activar a la enzima si bien la relación metal / ATP es diferente en cada caso : 3 para el Mg^{2+} , 1 para el Mn^{2+} , 2 para el Zn^{2+} y 4 para el Fe^{2+} . En cuanto a la especificidad frente a los nucleótidos la enzima es inactiva con el CTP y el GTP y solo alcanza un 13% de la actividad lograda con ATP 5 mM en presencia de ITP de la misma concentración y un 6% frente a UTP también 5 mM.

En Pinus radiata Valenzuela y col (132) han puesto de manifiesto la formación de PP-MVA a partir de MVA observando que la concentración de PP-MVA formado era muy pequeña lo que podía ser debido a la baja actividad de la fosfomevalonato cinasa en comparación con la pirofosfomevalonato descarboxilasa.

Potty y Bruemmer (142) han estudiado la fosfomevalonato cinasa en vesículas de zumo de los frutos de la naranja encontrando que el pH óptimo era de 6.5 y que la concentración óptima de ATP era de 7.5 mM. concentraciones superiores de ATP inhibían la formación de PP-MVA. Asimismo la enzima requería para su máxima actividad la adición de protectores de grupos -SH como β -mercaptoetanol y glutatión. La adición de iodoacetamida inhibía la actividad enzimática.

En cultivos de Kalanchoë crenata Thomas y Stobart (146) han estudiado la fosforilación del MVA observando la formación de PP-MVA en cantidades bastantes superiores a las de P-MVA. Asimismo la exposición a la luz de cultivos crecidos en la oscuridad originaba un aumento de la cantidad de PP-MVA formado.

La fosfomevalonato cinasa de Phaseolus vulgaris ha sido estudiada conjuntamente con la mevalonato cinasa por Hill y Rogers (147) La formación de PP-MVA era mayor a pH 7.5 que a pH 5.5 tanto en hojas como en cotiledones.

Green y Baisted (129) estudiando la fosfomevalonato cinasa de Pinus sativum observaron que el pH óptimo era 7.3 y que las 12 horas de germinación de las semillas la actividad de la enzima era máxima siendo el incremento un 400 % respecto a las 2 horas de germinación.

La fosfomevalonato cinasa de este origen resultó ser la segunda enzima más activa del proceso por el cual el MVA se convierte en escualeno.

En hojas y "cullus" de Nepeta cataria Downing y Mitchell (148, 149) han puesto de manifiesto la actividad fosfomevalonato cinasa observando que es necesario un mayor tiempo de incubación para obtener el máximo nivel de PP-MVA que el de P-MVA. En "callus" la actividad fosfomevalonato cinasa es menor que en hojas. La adición de iodoacetamida aumenta la cantidad de PP-MVA formado.

En Pinus pinaster García-Peregrín (136) observó que la formación de PP-MVA aumentaba con la adición al medio de incubación de glutatión ó cisteína 10^{-2} M mientras que la adición de ácido ascórbico 10^{-2} M inhibía aproximadamente un 40 % la formación de PP-MVA.

También estudió la influencia de diversos inhibidores de grupos -SH como iodoacetamida, p-hidroximercuribenzoato y N-etilmaleimida. Estos dos últimos inhibían completamente la formación de PP-MVA a una concentración 10^{-2} M mientras que la iodoacetamida a la misma concentración inhibía solo un 70%. La suplementación de glutatión disminuía la inhibición producida por iodoacetamida pero no así con la producida por p-hidroximercuribenzoato.

Asimismo en Agave americana García Peregrin (139) ha estudiado la incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA en extractos libres de células y extractos preparados a partir de polvos acetónicos obteniéndose cantidades similares de ambos lo que indica actividad fosfomevalonato cinasa. El pH óptimo fué 7.9

El β -mercaptoetanol añadido al tampón usado en la preparación de extractos aumenta considerablemente la cantidad de PP-MVA formado. El FNa añadido al medio de incubación protege al PP-MVA formado debido probablemente a la inhibición de la actividad fosfatasa presente en el medio.

II.- PLAN DE TRABAJO



II. - PLAN DE TRABAJO

A la vista de los antecedentes bibliográficos expuestos y de los trabajos anteriormente desarrollados en nuestro Departamento se planteó el siguiente plan general de trabajo:

1. - Establecimiento de las condiciones óptimas para el estudio "in vitro" de la del MVA por extractos de cerebro y riñón de pollo recién nacido.
2. - Establecimiento del papel del cerebro y del riñón en las primeras etapas del metabolismo del MVA durante el desarrollo postnatal del pollo.
3. - Estudio de las características de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa en preparaciones libres de células de ambos órganos.
4. - Comprobación de las posibles variaciones que ambas actividades enzimáticas presentan a lo largo de los primeros días del desarrollo postnatal del pollo.
5. - Estudio del efecto de algunos factores fisiológicos como suplementación de colesterol en la dieta, ayuno, ritmo cíclico luz-oscuridad, sobre la fosforilación del MVA en cerebro y riñón

III. - PARTE EXPERIMENTAL

III. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. - MATERIAL Y METODOS

3.1.1. - Material biológico

Se han utilizado pollos machos de raza Leghorn Blanca, cuyas edades oscilaron entre cero y diez días.

Los pollos se alimentaron con una dieta estandar,

3.1.2. - Preparaciones enzimáticas

El riñón ó cerebro eran extraídos del pollo muerto por decapitación y se ponían en solución salina al 0.9% a 4°C.

Cada uno de los órganos se homogenizaron con tampón Tris-malato 0.05 M. pH 7.5. La trituración se llevó a cabo en un homogenizador Potter mecanico (MSE) de pistilo de vidrio sin esmerilar a 4°C en proporción órgano/tampón 1:10 (p/v).

El homogenizado se centrifugó a 15.000 x g y 4°C en una centrifuga refrigerada Beckman modelo J 21 B durante 30 min. Una vez centrifugado, el sobrenadante fué usado como extracto libre de células.

3.1.3. – Preparación de tampones

El tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 se preparó mezclando soluciones de Tris-maleato 0.2 M (12.114 g de Tris Merck y 11 g de ácido maléico Merck en 1.000 ml) y NaOH 0.2 M (8g de NaOH Carlo Erba en 1.000 ml) en la proporción siguiente:

Tris-malato 0.2 M..... 50 ml
NaOH 0.2 M..... 50 ml

Esta mezcla se llevó hasta un volumen cercano a 200 ml con agua destilada y se terminó de ajustar con NaOH 0.2 M al pH indicado en pHmetro Beckman Spandomatic. Finalmente se completó con agua destilada a un volumen de 200 ml.

3.1.4. – Determinación del contenido protéico

La cantidad de proteínas de los extratos enzimáticos se determinó por el método de Lowry y col (69) basado en la asociación de las reacciones de biuret y de Folin, la primera característica de los enlaces peptídicos y la segunda del grupo fenólico de los restos de tirosina.

3.1.4.1. – Curva patron de la albúmina

Se ha usado curva patron de albumina bovina a concentraciones entre 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se prepara una solución estandar en agua destilada de albúmina bovina con un contenido de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A partir de ésta se prepara la curva patrón de la siguiente forma:

<u>Tubos</u>	<u>ml sol. estandar</u>	<u>ml agua</u>	<u>$\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína</u>
0	0	1.0	0
1	0.1	0.9	50
2	0.2	0.8	100
3	0.3	0.7	150
4	0.4	0.6	200
5	0.5	0.5	250

3. 1. 4. 2. – Metodica

Una vez preparada la curva patrón se preparan otros tubos de ensayo con 1 ml de las soluciones a medir haciendo varias diluciones de cada una de ellas para que la concentración protéica quede dentro del margen marcado por la curva patrón.

Se agregan a tiempo cero, 5 ml de la solución alcalina de cobre agitando bien en un agitador mecánico de tipo Whirlimixer. Al cabo de 15 minutos se añaden 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu mezclando perfectamente, 20 minutos después de esta última adición se hace la lectura a 630 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20, Bausch-Lomb ajustandolo el cero y el 100 de la escala con el blanco indicado.

3.1.4.3. - Cálculos

Con los resultados suministrados por las distintas concentraciones de la solución estandar se construye una curva patrón representando en ordenadas las densidades ópticas y en abcisas las concentraciones protéicas correspondientes expresadas en $\mu\text{g/ml}$. Sobre ella se llevan los valores de D.O. de los problemas, deduciéndose por interpolación, y una vez tenidas en cuenta las diluciones previas, la concentración protéica final (fig. 1 y 2).

3.1.4.4. - Reactivos

a) Albúmina bovina (Fracción V, Powder), suministrada por Armour Pharmaceutical Co. Chicago, Illinois, USA.

b) Solución alcalina de cobre. Mezclar 50 ml de solución al 2 % carbonato sódico (Merck) en NaOH (Carlo Erba) 0.1 M con 1 ml de solución al 0.5 % de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) en tartrato sódico al 1%. Se prepara extemporaneamente.

c) Reactivo diluido de Folin-Ciocalteu (Analema) que en el momento de hacer la determinación se diluyó al doble con agua destilada.

Figura nº 1

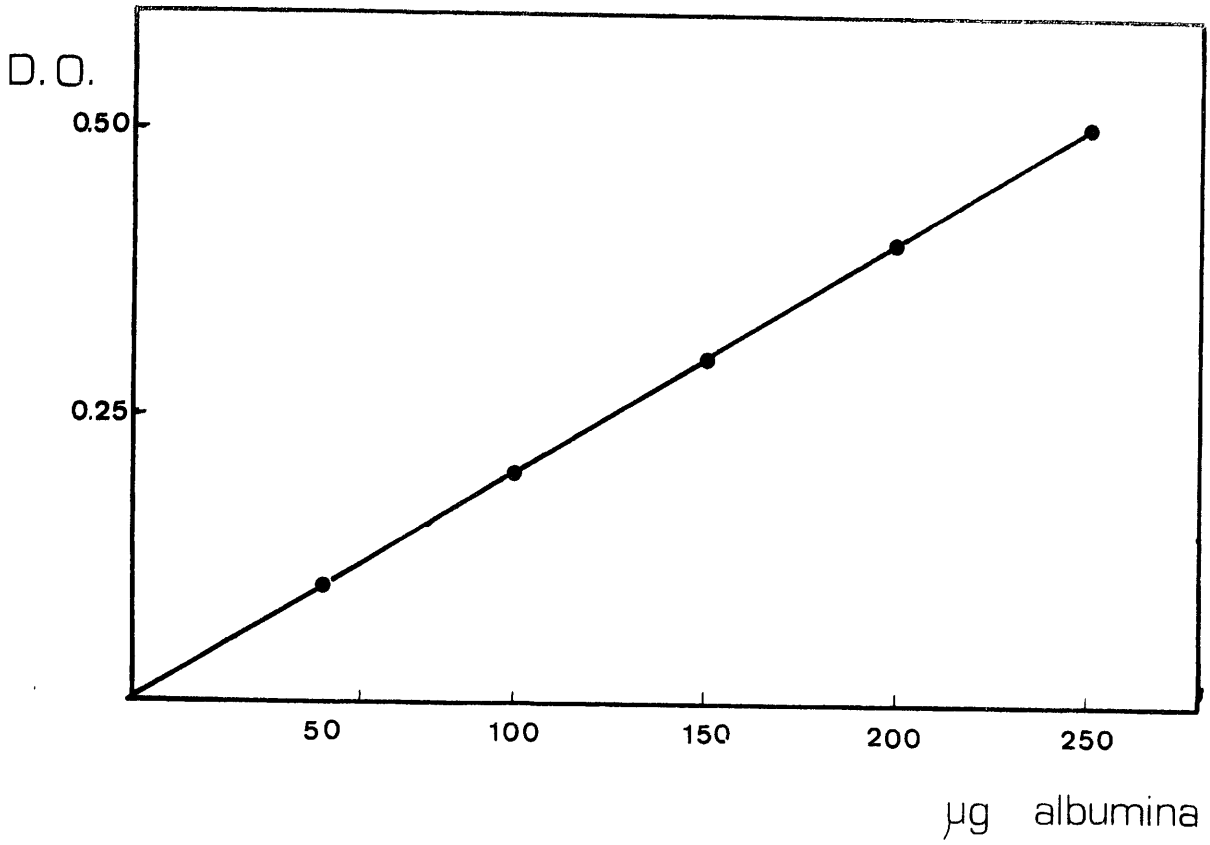
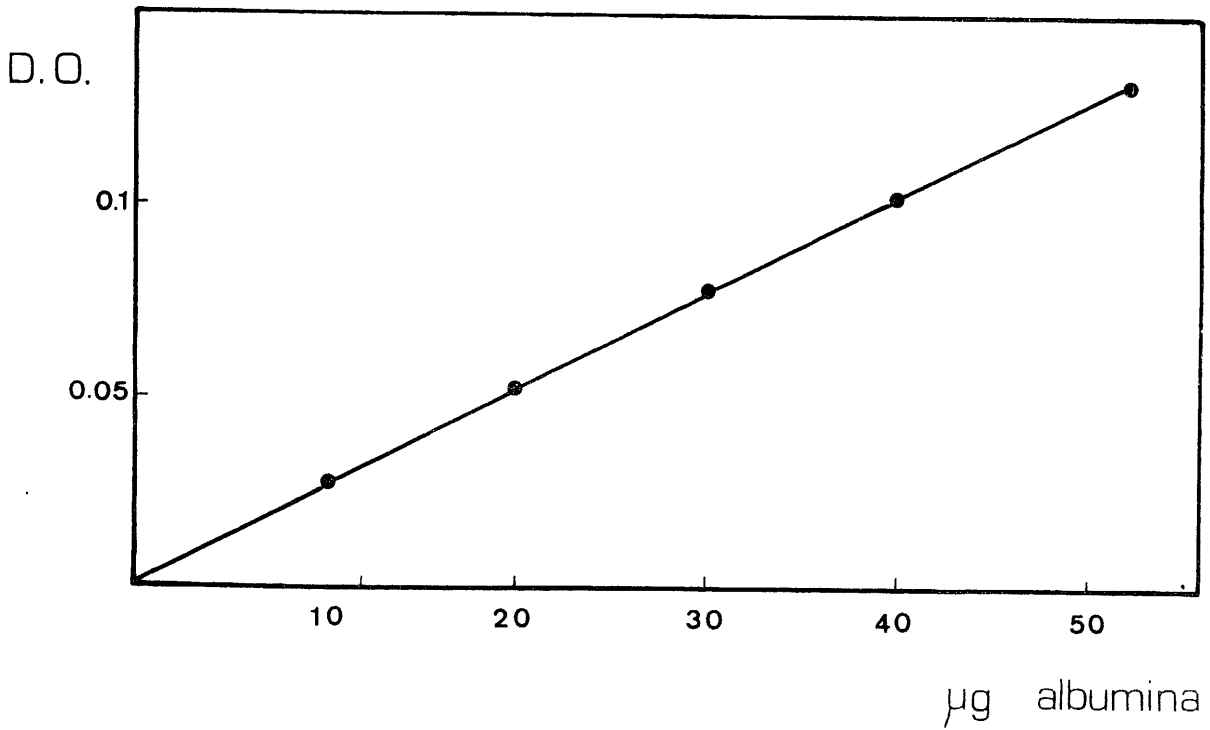


Figura nº 2



3. 1. 5. - Determinación de la actividad enzimática

3. 1. 5. 1. - Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C. durante tiempo variable en presencia de 2-¹⁴C-MVA, ATP y otros cofactores a concentraciones especificadas en cada caso.

Los extractos enzimáticos eran diluidos previamente hasta una concentración de proteínas que permitiera trabajar en la zona exponencial de la curva proteínas/actividad.

Las reacciones se detienen desnaturalizando las enzimas por calentamiento a 90°C durante 5 min. El precipitado se separa por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 min. a temperatura ambiente en centrifuga Piccolo (Martin Christ).

3. 1. 5. 2. - Reactivos utilizados

La solución de ácido mevalónico se ha preparado a partir de su lactona suministrada por "The Radiochemical Centre" Amersham Inglaterra.

Para pasar el ácido al estado de sal potásica se comienza por calentar a 50°C la solución bencénica hasta evaporación total del disolvente. Una vez seco se trata con una solución de KOH que contenga -en un volumen adecuado a la actividad final deseada- KOH en exceso respecto al número de equivalentes ácidos existentes. El pH de la disolución será aproximadamente 10. Dicha solución se mantiene a 37°C durante 30 min.

al cabo de los cuales se habrá roto el anillo lactónico originando la sal potásica que se conserva a -20°C hasta su utilización, antes de la cual es necesario mantenerla de nuevo a 37°C durante 30 min.

El MVA así preparado debe tener una actividad de $10\ \mu\text{ci}/\text{ml}$ y una concentración de $1.7\ \mu\text{mol}/\text{ml}$ concentración que se obtiene adicionando en caso de ser necesario la cantidad de MVA no radiactivo correspondiente. Para la reacción se han tomado $0.050\ \text{ml}$ quedando con una concentración de $33.3\ \mu\text{M}$ y $0.5\ \mu\text{ci}$ en un volumen final de $1.5\ \text{ml}$.

Siempre que no se especifique otra cosa la solución de ATP sal disódica (Sigma) se ha preparado extemporaneamente en Tampón Tris-maleato $0.05\ \text{M}$, $\text{pH}\ 7.5$ $49.14\ \text{mg}/\text{ml}$ de forma que tomando $0.150\ \text{ml}$ queda en el tubo la reacción, con volumen final de $1.5\ \text{ml}$, a una concentración $8\ \text{mM}$. El cloruro de Magnesio $6\ \text{H}_2\text{O}$ (Merck) se preparó en Tampón Tris-maleato $0.05\ \text{M}$ $\text{pH}\ 7.5$ ($24.39\ \text{mg}/\text{ml}$) de forma que tomando $0.050\ \text{ml}$ queda con una concentración final de $4\ \text{mM}$.

3.1.6. - Detección y medida de los productos de la reacción

3.1.6.1. - Radiocromatografía en papel

Los productos originados en las reacciones enzimáticas a partir de $\text{MVA}-2-^{14}\text{C}$ se han analizado mediante cromatografía en papel del sobrenadante obtenido después de la centrifugación anteriormente mencionada.

Se ha utilizado papel Whatman nº 1 preparando tiras de 35 mm de ancho y 85 mm de largo. A 3 cm. del origen se coloca la muestra, generalmente una alícuota de 25 μ l con micropipetas "emil Works" de enrase automático por estrangulamiento (Auto Cero High Precision) utilizando para el secado una corriente de aire caliente.

Se han utilizado campanas de cromatografía de vidrio hermeticamente cerradas y saturadas previamente con el líquido de desarrollo.

El líquido empleado ha sido butanol: ácido fórmico: agua (77:10:13), suministrados tanto el butanol como el ácido fórmico por Carlo Erba, el desarrollo es ascendente durante un tiempo de 12 h.

Una vez finalizado el desarrollo los cromatogramas se secan a temperatura ambiente, observándose el frente alcanzado por el disolvente bajo una lámpara monocromática de 260 nm "Havevia". Por el mismo procedimiento se pueden localizar los nucleótidos de la adenina que presentan un máximo de absorción a esta longitud de onda.

En este líquido de desarrollo los Rf observados para los productos de la reacción así como para el MVA que ha quedado sin reaccionar son los siguientes:

<u>Producto</u>	<u>Rf</u>
PP-MVA	0.01-0.05
P-MVA	0.10-0.15
MVA	0.75

3.1.6.2. - Detección y medida de radiactividad

Posteriormente se cortan las bandas de 35 mm de anchas -previamente señaladas a lápiz- y se unen unas a continuación de otras para medir su radiactividad en el sistema Actigraph III, mod. 1002 (Nuclear Chicago), constituido por dos detectores tipo Geiger de flujo gaseoso situados muy próximos entre los cuales para el cromatograma. Los impulsos producidos pasan a un registrador obteniéndose una gráfica en la que cada pico corresponde a una sustancia marcada. Como gas portador se ha utilizado el gas Q (helio-butano).

Se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo: escala, 5.000; velocidad, 30; anchura de colimador 12 y constante de tiempo 10.

3.1.6.3. - Expresión de la actividad específica

Los picos de radiactividad obtenidos al pasar el cromatograma por los contadores Geiger vienen expresados directamente en c.p.m. Para pasar a d.p.m. construimos una curva patron en la cual ponemos cantidades conocidas de MVA-2-¹⁴C que al pasar por el "Actigraph" nos darán las c.p.m. correspondientes a cada valor de d.p.m. (fig. 3 y tabla 1) este proceso se repetiría en caso de medir en las distintas escalas del aparato.

Los valores de c.p.m. obtenidos en las reacciones enzimáticas se interpolan en la curva, obteniéndose las d.p.m. de la alícuota puesta en el papel de cromatografía, la cual se transforma en d.p.m. totales multiplicando por el factor de corrección adecuado. Estas d.p.m. totales se dividen por la cantidad específica expresada en d.p.m./mg de proteína.

TABLA I

<u>μCi</u>	<u>d.p.m.</u>	<u>c.p.m.</u>
1×10^{-4}	222	60
2×10^{-4}	444	90
3×10^{-4}	666	145
4×10^{-4}	888	175
5×10^{-4}	1.110	225
6×10^{-4}	1.330	250
8×10^{-4}	1.776	350
1×10^{-3}	2.220	400
1.2×10^{-3}	2.664	500

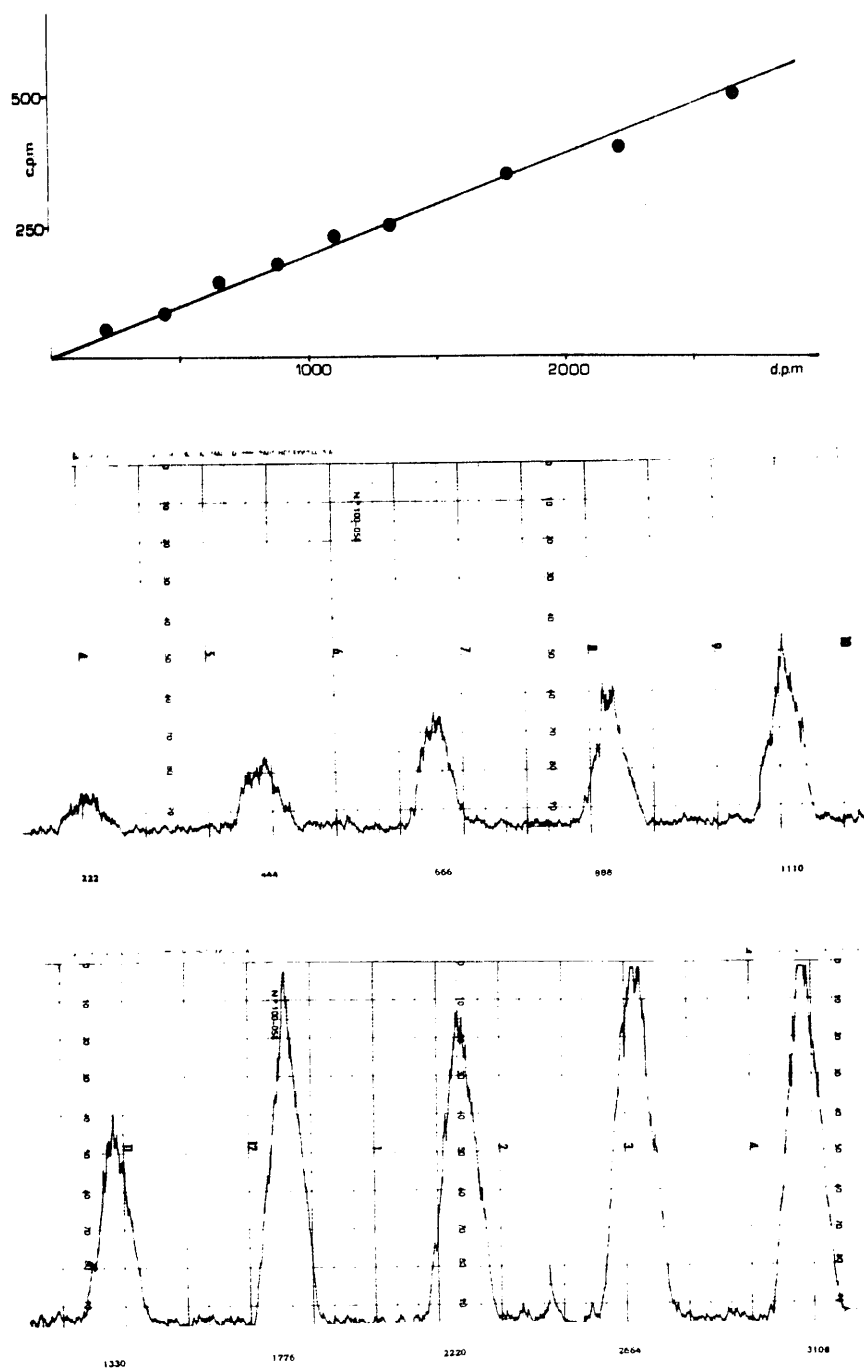


Fig. 3.- Proporcionalidad entre la actividad de las muestras (en d.p.m.) y la altura de los picos registrados en la gráfica (en c.p.m.). Condiciones de medida: Col. = 12; CT. = 10; Esc. = 500; Vel. = 30.

3.2. - RESULTADOS

3.2.1. - FOSFORILACION DEL ACIDO MEVALONICO EN CEREBRO DE POLLO RECIEN NACIDO

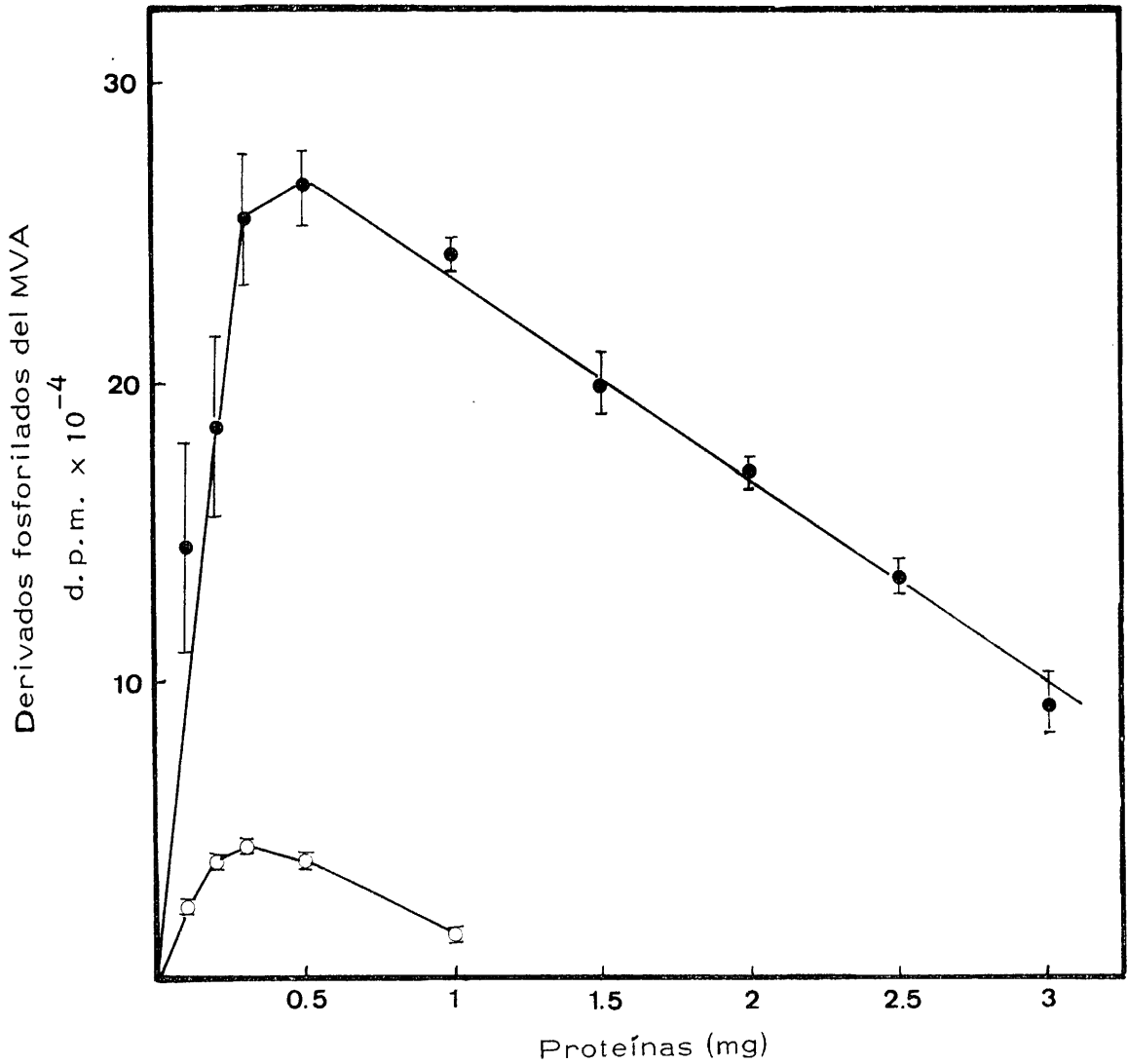
3.2.1.1. - Influencia de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

Con objeto de hallar la zona exponencial de la curva proteínas/actividad fosforilante que nos permitiera trabajar con una concentración de proteínas en los extractos que fuera proporcional a la cantidad de productos obtenidos, se hicieron reacciones enzimáticas con un margen de 0 a 3 mg de proteínas. Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C durante 30 minutos en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM), $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. La representación gráfica de los resultados hallados de dichas reacciones muestran que la cantidad de P-MVA formado es proporcional hasta 0.3 mg de proteína mientras que el PP-MVA formado se incrementa linealmente hasta 0.2 mg de proteínas (Fig nº 4)

3.2.1.2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones

Con objeto de determinar el tiempo óptimo de la reacción enzimática se hicieron experiencias incubando los extractos a 37°C durante diferentes tiempos, en un intervalo de 0-120 minutos. Las reacciones se hicieron en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM) ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci)

Figura nº 4



Influencia de la concentración de proteínas de extractos libres de células de cerebro de pollo, sobre la formación de derivados del MVA. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○). PP-MVA observado.

en un volumen final de 1.5 ml.

Se observó que tanto la formación de P-MVA como de PP-MVA aumenta linealmente hasta los 30 minutos, momento a partir del cual se mantiene en los mismos niveles (Fig. nº 5).

3.2.1.3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA

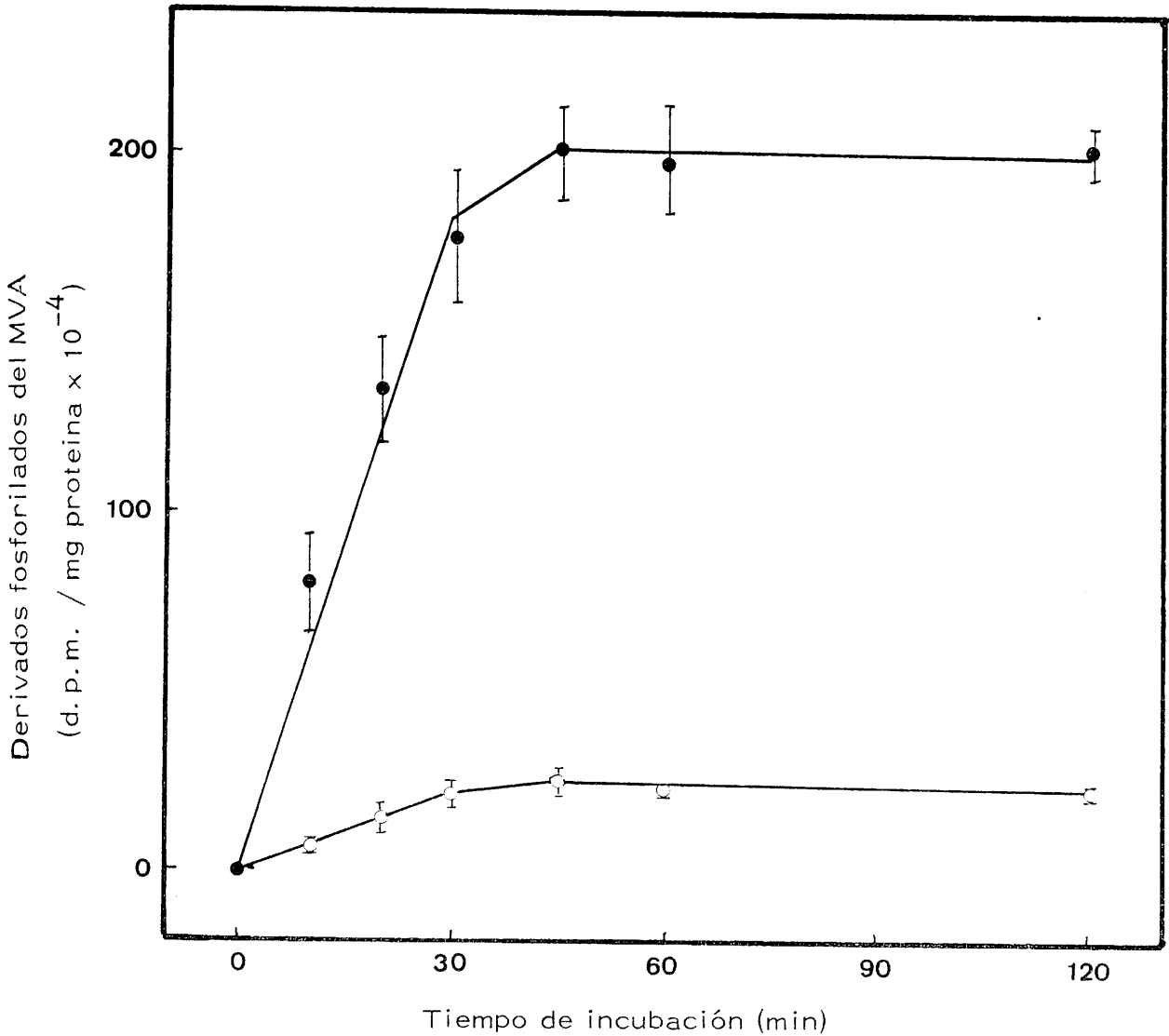
Se hicieron reacciones en medio de tampón Tris-maleato 0.05 M y pH comprendido entre 5.5 y 9.5. y en presencia de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3. μM , 0.5 μCi) en un volumen final de 1.5 ml, incubando a 37°C durante 30 min.

Como puede apreciarse en la Fig nº 6 tanto la cantidad de P-MVA como de PP-MVA aumenta al aumentar el pH dentro del margen ensayado, alcanzando las cantidades mayores de ambos derivados fosforilados a pH 9.5

3.2.1.4. - Distribución intracelular de los enzimas fosforilantes del MVA

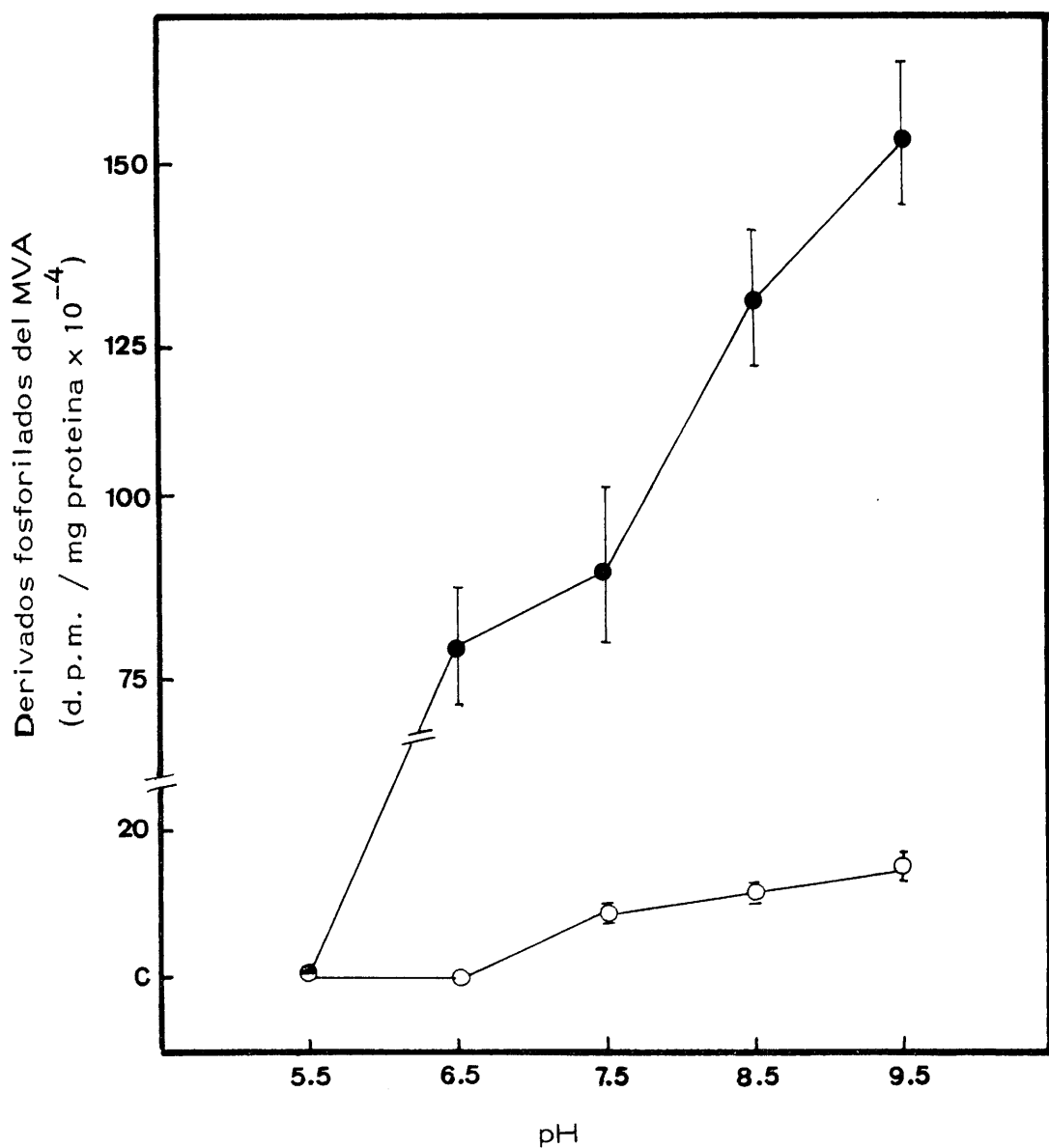
Con objeto de estudiar la localización de las enzimas fosforilantes del MVA se midieron actividades mevalonato cinasa y fosfo-mevalonato cinasa en las distintas fracciones subcelulares.

Figura nº 5



Influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. (●) P-MVA observado, (○) PP-MVA observado.

Figura nº 6



Efecto del pH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○) PP-MVA observado

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl_2Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml.

Los resultados obtenidos (Tabla II) muestran que ambas actividades enzimáticas se localizan esencialmente en la fracción soluble (sobrenadante de 105.000 $\times g$).

3.2.1.5. - Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA

Las preparaciones enzimáticas se sometieron a temperaturas de 50°C y 65°C a diferentes tiempos entre 0 y 60 min. En estas condiciones no se observó ninguna formación de PP-MVA. La Fig. nº 7 muestra la inactivación total de la mevalonato cinasa al ser sometida 10 min a 65°C mientras que el tratamiento a 50°C origina un pequeño incremento de la actividad específica de la mevalonato cinasa a los 10 min de tratamiento, bajando un 75% de esta actividad a partir de los 15 min de preincubación.

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl_2Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml.

3.2.1.6. - Efecto de los nucleótidos

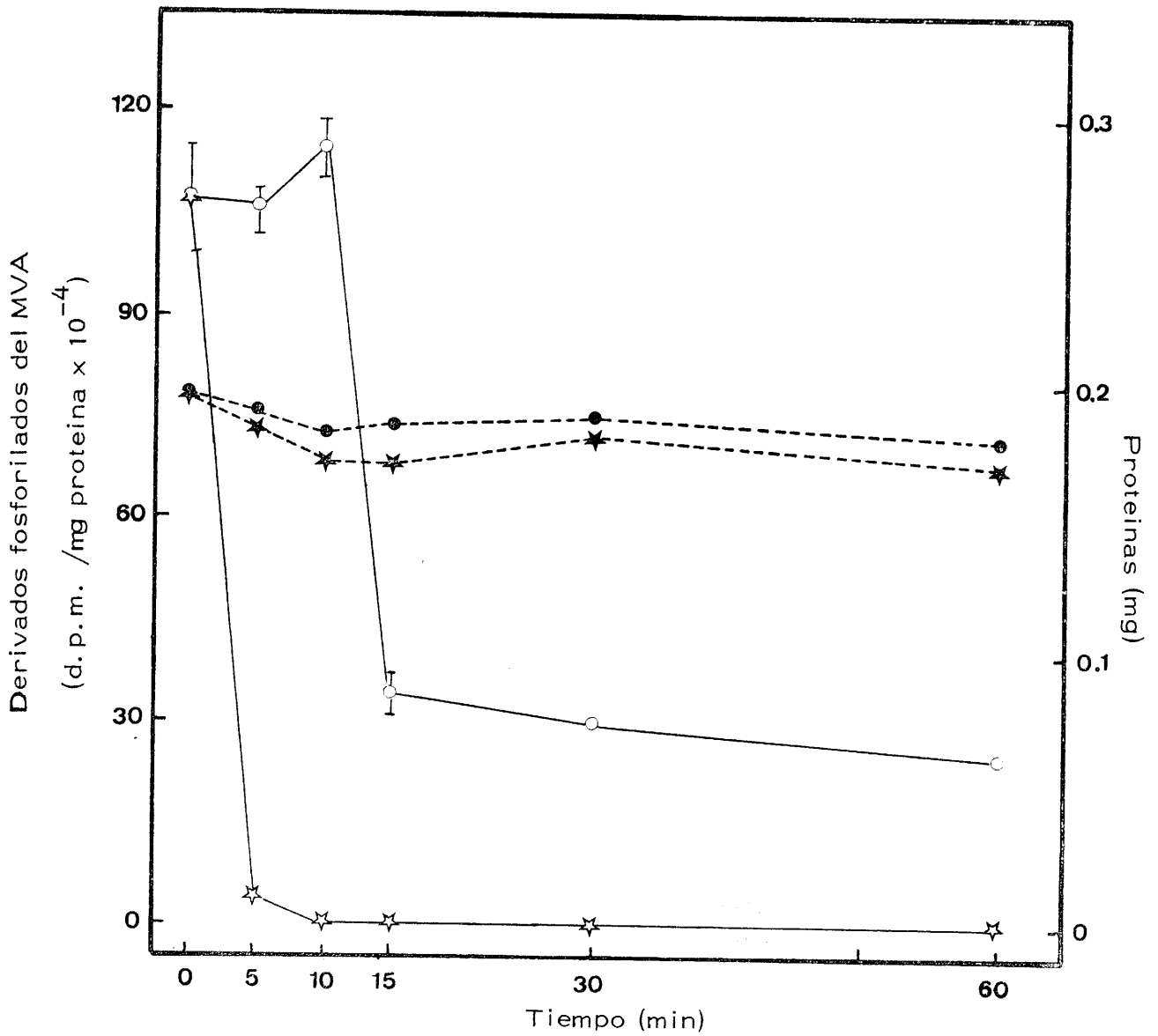
Para estudiar los requerimientos nucleotídicos de la formación de P-MVA y PP-MVA se hicieron reacciones enzimáticas en las

TABLA II

Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del MVA, por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

	Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
	P - MVA	PP - MVA
Extracto libre de células	48.7 \pm 3.7	3.2 \pm 0.1
Sobrenadante 15.000 xg	89.0 \pm 2.0	15.0 \pm 2.0
Precipitado 15.000 xg	17.5 \pm 2.3	0.0
Sobrenadante 105.000 xg	168.8 \pm 9.1	8.0 \pm 0.3
Precipitado 105.000 xg	22.7 \pm 3.9	0.0

Figura nº 7



Estabilidad térmica las enzimas fosforilantes del MVA. Efecto de la preincubación a distintas temperaturas de extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media. Los puntos unidos con líneas continuas representan la cantidad de P-MVA observado - tras el mantenimiento de los extractos a 50°C (○) y a 65°C (☆). Los puntos unidos con líneas discontinuas representan la concentración protéica de los extractos tras la preincubación de los mismos a 50°C (●) y a 65°C (✱).

cuales se ensayaron los nucleótidos ATP, ITP, UTP, y GTP a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM en un medio de Tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) con volumen final 1.5 ml y $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3. μM y 0.5 μci).

Los resultados de la Tabla III muestran la necesidad total de nucleótidos para la fosforilación del MVA, siendo el ATP con el que se alcanza mayor cantidad de derivados fosforilados, tanto de P-MVA como de PP-MVA seguido en efectividad por el ITP. Con el UTP y el GTP la cantidad de P-MVA y PP-MVA formado es muy pequeña (Fig. nº 8). La formación de P-MVA en presencia de ATP y de ITP se incrementa a medida que lo hace la concentración de nucleótido adicionado, alcanzándose el máximo en presencia de nucleótido 10.0 mM. Sin embargo, la cantidad de PP-MVA observado es mayor en presencia de ATP ó ITP 5.0 mM, disminuyendo ligeramente cuando el nucleótido se suplementa a concentración 10.0 mM.

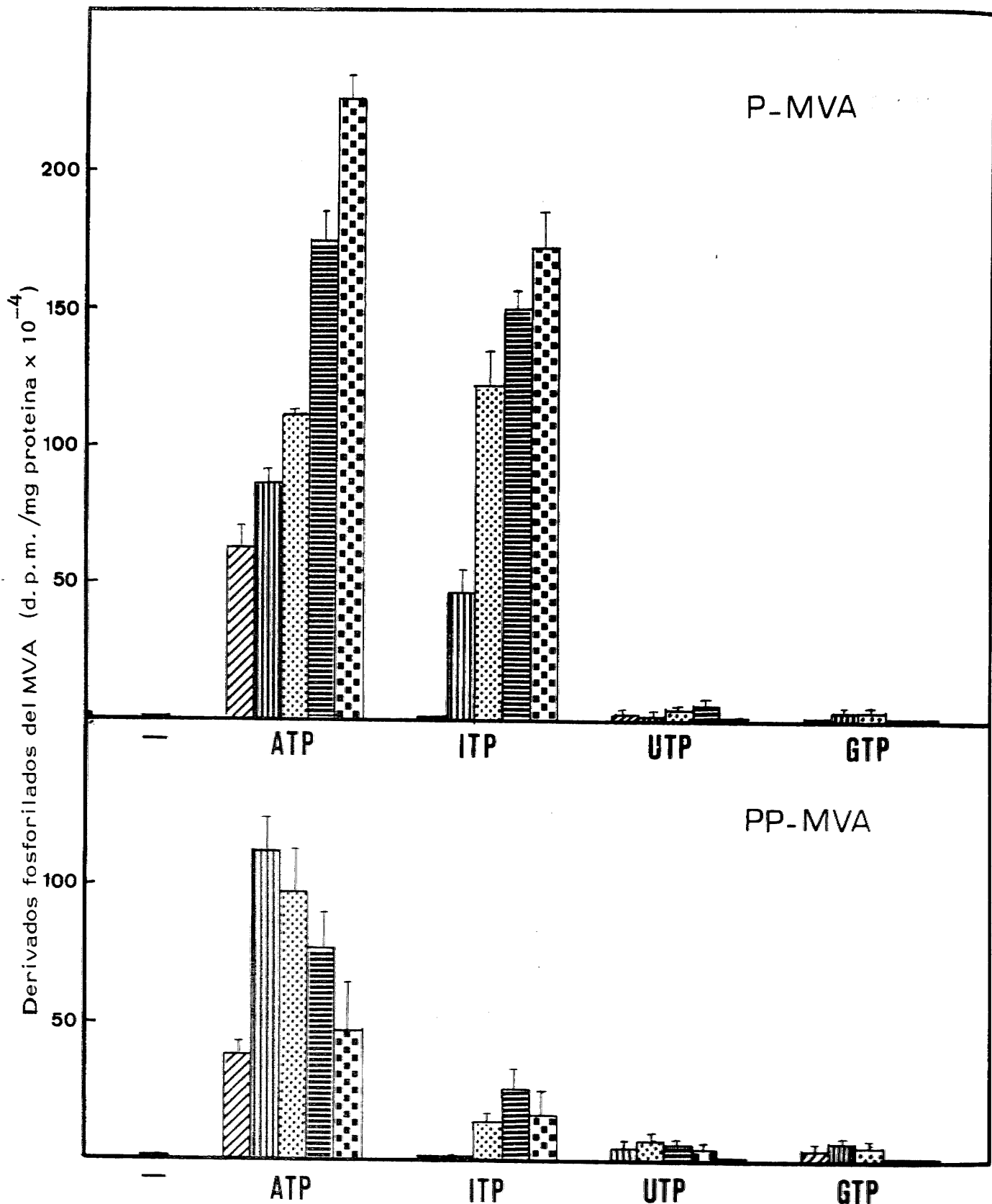
3.2.1.7. - Efecto de los cationes divalentes

Como todas las cinasas, la mevalonato cinasa y la fosfomevalonato cinasa requieren la presencia de cationes divalentes, para su actuación. Por tal motivo se ensayaron las reacciones de incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA por extractos libres de células en presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} , a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM. El volumen final de la reacción fué 1.5 ml en medio de tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM), ATP

TABLA III

Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP, y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos, excepto los nucleótidos cuya concentración final fué indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteína $\times 10^{-4}$)	
Nucleótido	Concentración (mM)	P-MVA	PP - MVA
—	—	0.0	0.0
ATP	0.1	63.1 \pm 6.8	39.3 \pm 4.8
	0.5	86.5 \pm 4.5	112.4 \pm 13.2
	1.0	111.2 \pm 0.0	96.5 \pm 13.6
	5.0	174.8 \pm 10.8	77.6 \pm 15.5
	10.0	226.5 \pm 7.1	47.1 \pm 17.4
ITP	0.1	0.0	0.0
	0.5	47.2 \pm 7.9	0.0
	1.0	122.2 \pm 12.9	13.8 \pm 1.5
	5.0	149.4 \pm 6.8	24.7 \pm 5.8
	10.0	173.2 \pm 13.1	18.9 \pm 8.2
UTP	0.1	3.0 \pm 0.2	4.6 \pm 1.7
	0.5	2.8 \pm 0.2	7.0 \pm 1.2
	1.0	5.9 \pm 1.6	5.9 \pm 0.2
	5.0	5.9 \pm 0.2	4.9 \pm 1.0
	10.0	0.0	0.0
GTP	0.1	0.0	4.0 \pm 1.1
	0.5	3.0 \pm 0.3	6.9 \pm 0.8
	1.0	3.9 \pm 0.9	5.9 \pm 0.2
	5.0	0.0	0.0
	10.0	0.0	0.0



Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los nucleótidos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (//), 0.5 mM (|||), 1.0 mM (•••), 5.0 mM (≡), 10.0 mM (◻◻). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

(8 mM) y MVA, $2\text{-}^{14}\text{C}$ - (33.3 μM , 0.5 μCi).

Los resultados reflejados en la Tabla IV expresan en primer lugar que sin la suplementación de iones metálicos se produce solo una pequeña cantidad de P-MVA. Por otra parte puede observarse que en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} se incrementa fuertemente la fosforilación del MVA, si bien a pequeñas concentraciones el Mn^{2+} es mucho más efectivo que el Mg^{2+} . Sin embargo cuando aumenta la concentración de ión Mn^{2+} adicionado se observa una fuerte disminución de la cantidad de P-MVA formado mientras que en presencia de Mg^{2+} a las mismas concentraciones la formación de P-MVA continúa aumentando alcanzándose, a concentraciones 5.0 y 10.0 mM, cantidades de P-MVA mayores en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (Fig. nº 9).

La formación de PP-MVA es ligeramente superior en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} a elevadas concentraciones (5.0-10.0 mM) únicas a las que se ha puesto de manifiesto la formación de este derivado fosforilado del MVA.

En presencia de los iones metálicos Ca^{2+} y Zn^{2+} la fosforilación del MVA es muy escasa, observándose solo una pequeña cantidad de P-MVA.

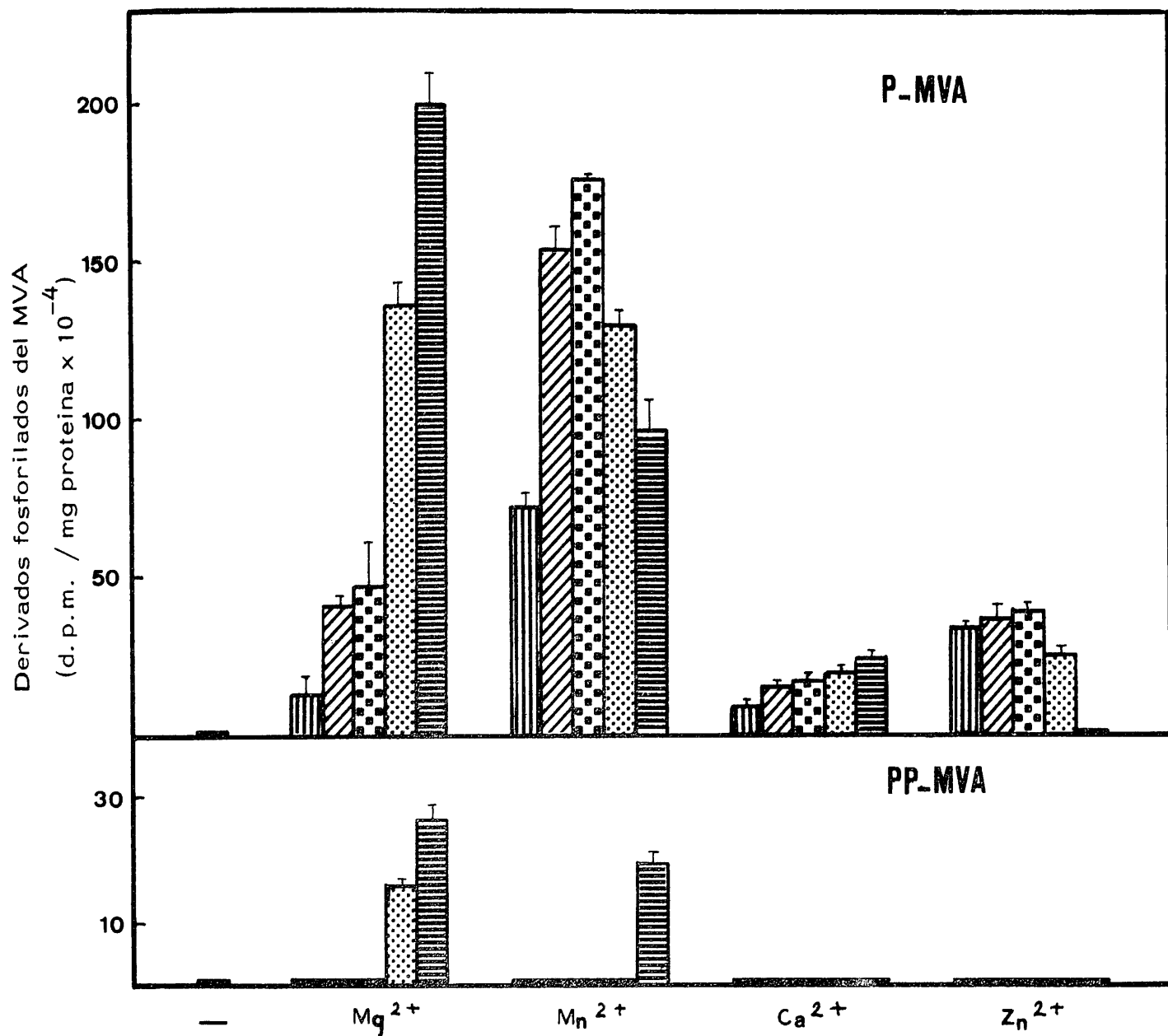
Como era de esperar en presencia de ion Hg^{2+} se obtiene la inactivación total de la fosforilación del MVA a cualquiera de las concentraciones adicionadas.

TABLA IV

Efecto de algunos cationes divalentes sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos excepto los iones metálicos cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Ión metálico	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
—	—	18.6 \pm 1.6	0.0
Mg ²⁺	0.1	12.8 \pm 6.4	0.0
	0.5	41.2 \pm 2.5	0.0
	1.0	47.3 \pm 14.2	0.0
	5.0	136.1 \pm 8.1	16.1 \pm 1.1
	10.0	200.7 \pm 10.1	26.4 \pm 5.1
Mn ²⁺	0.1	72.3 \pm 5.1	0.0
	0.5	154.0 \pm 8.1	0.0
	1.0	176.0 \pm 0.0	0.0
	5.0	129.8 \pm 4.6	0.0
	10.0	97.2 \pm 11.2	19.5 \pm 3.0
Ca ²⁺	0.1	8.9 \pm 0.7	0.0
	0.5	15.5 \pm 1.4	0.0
	1.0	16.3 \pm 2.1	0.0
	5.0	18.5 \pm 0.2	0.0
	10.0	24.4 \pm 0.7	0.0
Zn ²⁺	0.1	33.6 \pm 1.1	0.0
	0.5	37.1 \pm 4.3	0.0
	1.0	38.4 \pm 0.4	0.0
	5.0	25.6 \pm 2.9	0.0
	10.0	0.0	0.0

Figura nº 9



Efecto de los cationes divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los iones metálicos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (||||), 0.5 mM (///), 1.0 mM (□□□), 5.0 mM (⊘) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

3. 2. 1. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos -SH

Se ha estudiado la actividad de las enzimas fosforilantes de MVA en presencia de algunos protectores de grupos -SH (ditiotretol, glutatión, cisteína y mercapto-etanol) a concentraciones 0.1, 1.0 y 10.0 mM. Como puede verse en la Tabla V las cantidades de P-MVA formados no se incrementaron cuando estos reactivos se añadieron al medio estandar de la reacción enzimática e incluso se observó una ligera disminución en la formación de P-MVA en presencia de DTT y de glutatión, así como a elevadas concentraciones de cisteína.

Para el PP-MVA hay una ligera activación con DTT a las concentraciones 0.1 mM y 1.0 mM para inhibirse a 10.0 mM. Tampoco se observó cantidad alguna de PP-MVA con glutatión a cualquier concentración y con cisteína 10.0 mM.

El β -ME prácticamente no influye sobre la formación de derivados fosforilados del MVA (Fig. nº 10)

3. 2. 1. 9. -Efecto de algunos inhibidores de grupos-SH

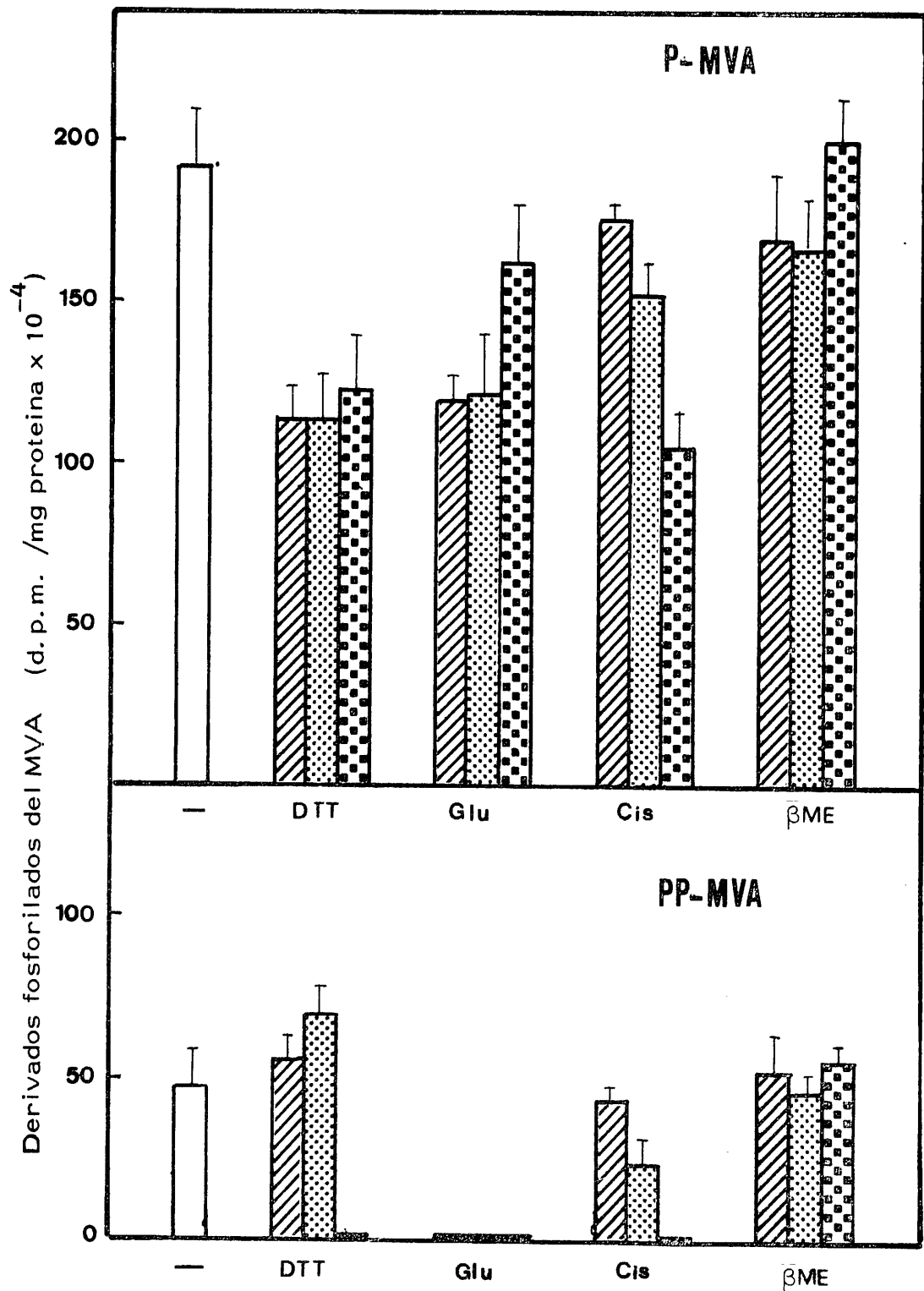
La Tabla VI nos muestra que la actividad mevalonato cinasa fué totalmente inhibida cuando se adicionó p-hidroximercuribenzoato al medio estandar de la reacción a partir de una concentración 0.01 M

En las reacciones a las que se adicionó ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), a una concentración de 1.0 mM se obtuvo aproximadamente solo el 50 % de la actividad mientras que a 10.0 mM la inhibición

TABLA V

Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estándar de los reactivos suplementada con el protector cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteína 10^{-4})								
Protector	Concentración (mM)	Nº exp.	P-MVA	t	p	PP-MVA	t	p
—	—	3	192.3 \pm 20.0			47.4 \pm 12.2		
Ditiotreitol	0.1	3	114.4 \pm 6.7	3.4	<0.02	55.5 \pm 7.8	0.5	<0.9
	1.0	3	114.4 \pm 11.0	3.2	<0.05	68.8 \pm 9.8	1.3	<0.9
	10.0	3	122.6 \pm 18.8	2.4	<0.1	0.0		
Glutation	0.1	3	118.6 \pm 7.9	3.2	<0.05	0.0		
	1.0	3	119.8 \pm 20.0	2.6	<0.05	0.0		
	10.0	3	102.0 \pm 16.4	3.5	<0.02	0.0		
Cisteina	0.1	3	174.5 \pm 4.6	0.8	<0.5	43.2 \pm 3.9	0.3	<0.9
	1.0	3	151.6 \pm 14.4	1.5	<0.2	23.6 \pm 7.8	1.6	<0.3
	10.0	3	104.7 \pm 14.5	3.3	<0.5	0.0		
Mercaptoetanol	0.1	3	169.1 \pm 20.0	0.7	<0.5	53.1 \pm 13.7	0.3	<0.9
	1.0	3	161.4 \pm 15.0	1.1	<0.5	45.2 \pm 5.9	0.1	<0.9
	10.0	3	198.6 \pm 13.6	0.2	<0.9	55.0 \pm 3.9	0.5	<0.9



Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los protectores suplementados fué: 0.1 mM (//), 1.0 mM (•••) y 10.0 mM (■). los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

TABLA VI

Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el inhibidor cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

P-MVA					
Inhibidor	Concentración (mM)	Nº exp.	d. p. m. /mg proteína 10^{-4}	t	p
—	—	3	192.0 \pm 21.4		
N-etil-maleimida	0.01	3	175.0 \pm 7.0	1.2	<0.3
	0.1	6	182.2 \pm 14.0	0.3	<0.5
	1.0	6	189.2 \pm 14.0	1.28	<0.2
	10.0	6	166.6 \pm 3.0	1.9	<0.1
p-hidroxi-mercuribenzoato	0.01	6	0.0		
	0.1	6	0.0		
	1.0	6	0.0		
	10.0	6	0.0		
5,5'-ditiobis-nitrobenzoico	0.01	6	185.7 \pm 5.6	2.0	<0.1
	0.1	6	170.1 \pm 2.4	1.7	<0.1
	1.0	6	114.9 \pm 2.0	0.8	<0.3
	10.0	6	0.0		

fué total (Fig. nº 11).

La N-etilmaleimida no produjo practicamente ninguna inhibición a concentraciones semejantes a los otros agentes ensayados (0.01 -10.0 mM).

En presencia de cualquiera de los tres inhibidores ensayados a todas las concentraciones, no se observó ninguna formación de PP-MVA.

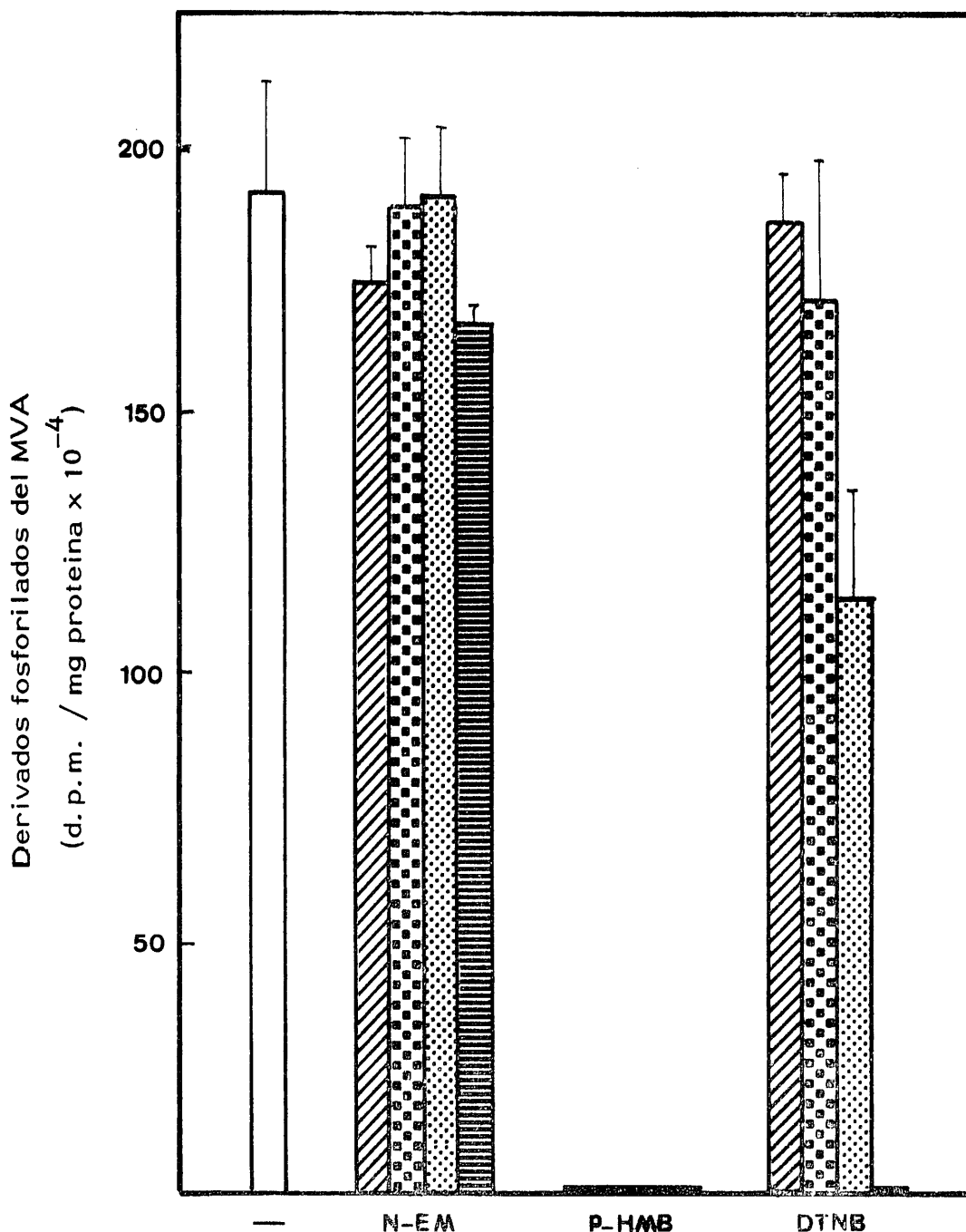
3. 2. 1. 10. - Influencia de la edad del pollo

La diferente cantidad de derivados fosforilados formados a lo largo del desarrollo durante el periodo de tiempo estudiado (de 0 a 10 días de edad) queda reflejado en la Fig. nº 12.

Como puede apreciarse en dicha figura la actividad específica se mantiene a niveles semejantes durante los cuatro primeros días de vida del pollo aunque con ligera tendencia a bajar, siendo clara la disminución de derivados fosforilados de MVA formados entre los 5 y 10 días.

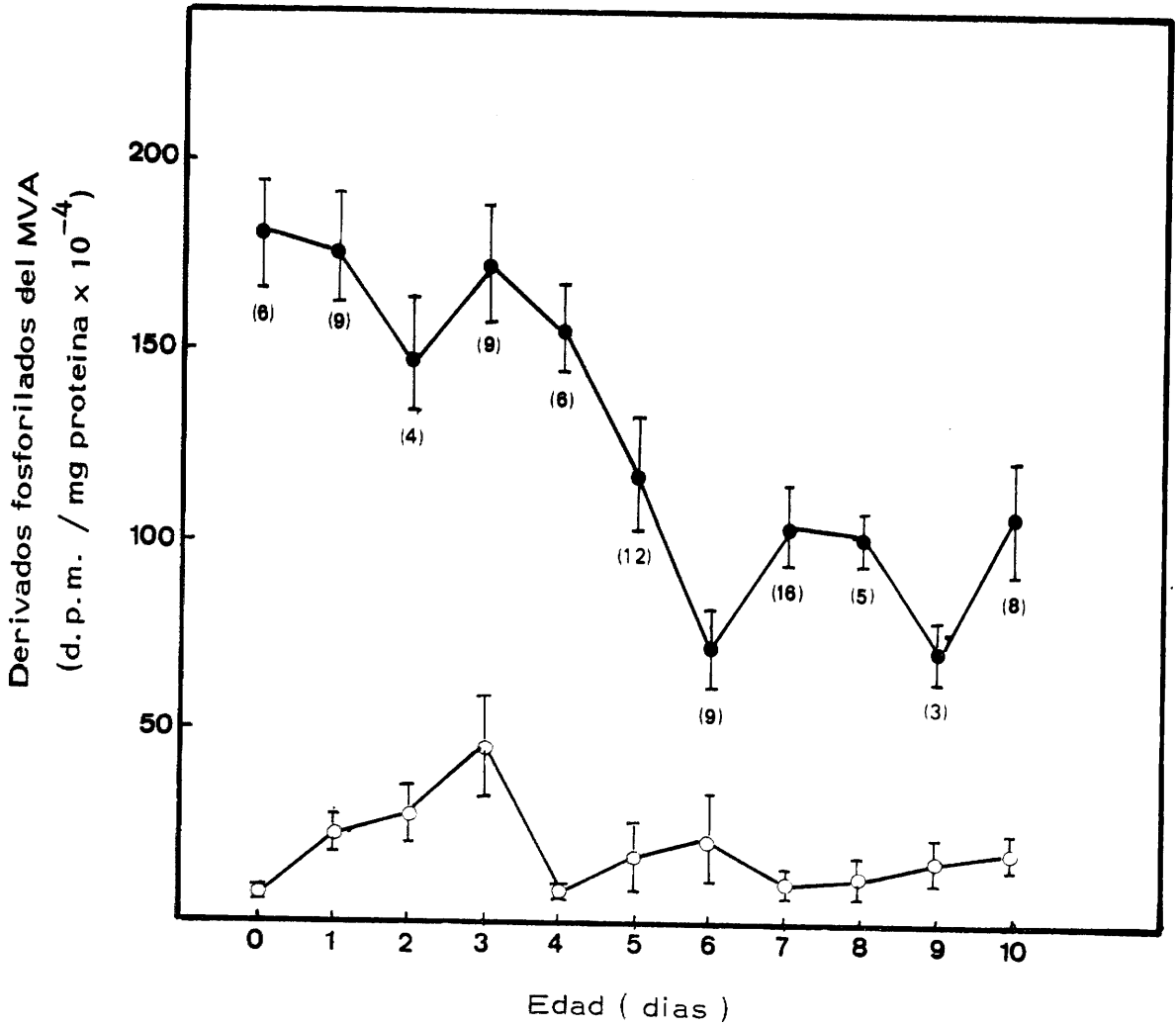
En cuanto al PP-MVA formado se observa un ligero aumento en pollos de 3 días, manteniendose prácticamente constante en el resto de las edades.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C durante 30 min. los extractos de cerebro de pollo de las distintas edades indicadas con la mezcla reactiva estandar.



Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. La concentración final de los inhibidores suplementados fué 0.01 mM (//), 0.1 mM (■), 1.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 12



Influencia de la edad sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA (○) PP-MVA.

3. 2. 1. 11. - Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta

Con objeto de estudiar el efecto de la suplementación de colesterol a la dieta normal sobre la fosforilación del MVA, se efectuaron unas experiencias preliminares en las que pollos de 3 días fueron alimentados durante 24, 48 y 72 h con una dieta adicionada de colesterol al 5 ‰, manteniendo un lote semejante de pollos con la alimentación normal. Como puede observarse en la Tabla VII, la cantidad de P-MVA formado en pollos alimentados con dieta suplementada con colesterol parece ser ligeramente inferior a la obtenida en pollos controles.

Dada la pequeña duración del tratamiento así como los pocos días de edad de los pollos, se hicieron tres series de experiencias en las que se separaron dos lotes semejantes de pollos recién nacidos, uno de los cuales se alimentó con dieta suplementada con colesterol al 5 ‰ desde el primer momento, y el otro se mantuvo con una dieta normal (controles). Al cabo de 6 días de vida y tratamiento se sacrificaron diariamente una serie de pollos de ambos lotes, comparandose la capacidad fosforilante del MVA por extractos libres de células de cerebro. Los resultados, puestos de manifiesto en la tabla VIII, parecen indicar que no existe una influencia significativa de la suplementación con colesterol sobre la formación de P-MVA y PP-MVA. Al menos durante el periodo de tiempo ensayado (6-10 días), no se observaron claras diferencias en las cantidades de P-MVA y PP-MVA formados por los lotes control y alimentados con colesterol.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando los extractos enzimáticos de cerebro de pollo controles y tratados a 37°C durante 30 min con la mezcla reactiva estandar.

TABLA VII

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa

P - MVA observado (d. p.m. /mg proteína $\times 10^{-4}$)				
Edad (días)	horas de tratamiento	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p
6	—	164.0 \pm 10.6		
7	24	90.8 \pm 12.3	57.0 \pm 10.5	< 0.2
8	48	92.2 \pm 4.7	72.4 \pm 4.6	< 0.05
9	72	158.3 \pm 15.5	136.0 \pm 29.2	< 0.9

TABLA VIII

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. Los días que corresponden a la edad corresponden también a tiempo de tratamiento con dieta de colesterol. El \pm representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA				PP - MVA		
Edad (días)	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P
6	34.2 \pm 6.6	38.5 \pm 4.5	<0.9	4.6 \pm 2.3	0.0	
7	59.7 \pm 13.8	57.7 \pm 12.8	<0.9	4.1 \pm 0.0	11.6 \pm 4.0	<0.9
8	89.0 \pm 1.8	84.6 \pm 5.6	<0.3	17.9 \pm 3.7	14.7 \pm 5.2	<0.5
9	75.0 \pm 9.0	50.8 \pm 1.5	<0.02	17.6 \pm 5.2	11.0 \pm 1.4	<0.2
10	97.8 \pm 9.6	82.7 \pm 10.6	<0.3	7.4 \pm 1.2	18.8 \pm 8.6	<0.01

3. 2. 1. 12. - Influencia del ayuno

Se ha estudiado la posible influencia del ayuno sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de cerebro de pollo. Para ello, un lote de pollos de 7 días se sometió a ayuno durante 24-48 h., comparandose la capacidad fosforilante del MVA frente a otro lote de animales control de la misma edad. Como se puede observar en la Tabla IX, no se aprecian diferencias significativas en las cantidades de P-MVA y PP-MVA formados por ambos lotes de pollos.

3. 2. 1. 13. - Influencia del ritmo luz-oscuridad

Con objeto de estudiar la posible influencia del ritmo luz-oscuridad sobre las enzimas fosforilantes del MVA, se ha sometido un lote de animales a un tratamiento de 12 h de luz seguido de 12 h de oscuridad durante los primeros 7 días de vida, al cabo de los cuales se fueron sacrificando con un intervalo de 3 h. Los resultados obtenidos tras las reacciones enzimáticas llevadas a cabo con los extractos libres de células de cerebro ponen de manifiesto (Fig. nº 13) que, aunque se observaron ligeras variaciones en la cantidad de P-MVA formado, no puede deducirse la existencia de un ritmo cíclico luz-oscuridad para la fosforilación del MVA por el cerebro de pollo durante los primeros días de su desarrollo postnatal.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C durante 30 min. los extractos de cerebro de pollo extraído, a las distintas horas del día y de la noche, con la mezcla reactiva estándar.

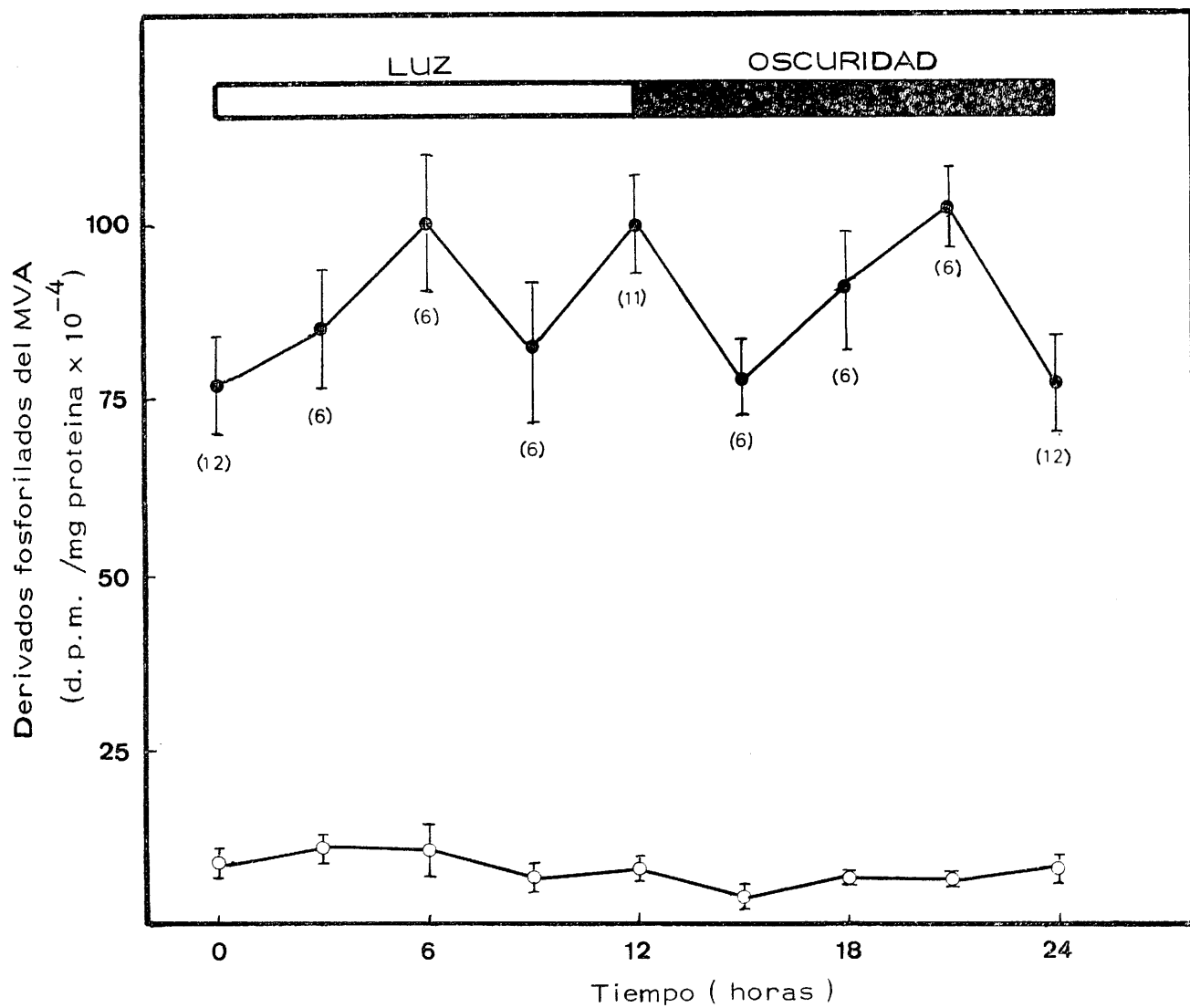
TABLA IX

Influencia del ayuno sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de cerebro de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA			PP - MVA			
horas de ayuno	Controles	Ayunados	p	Controles	Ayunados	p
24	89.0 \pm 1.8	82.3 \pm 7.5	< 0.3	17.9 \pm 3.7	12.9 \pm 2.2	< 0.3
48	75.3 \pm 0.5	72.5 \pm 0.8	< 0.4	10.8 \pm 0.3	11.4 \pm 1.5	< 0.3



Figura nº 13



Influencia del ritmo circadiano sobre la fosforilación del MVA por extracto libres de células de cerebro de pollo con la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representa el error estandar de la media. (●) P-MVA, (○) PP-MVA.

3. 2. 2. - FOSFORILACION DEL ACIDO MEVALONICO EN RIÑON DE POLLO RECIEN NACIDO

3. 2. 2. 1. - Influencia de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

Al igual que en cerebro se comenzó el estudio de la fosforilación del ácido mevalónico en extractos libres de células de riñón de pollo hallando el rango de concentración protéica del extracto para el cual hay proporcionalidad entre cantidad de proteínas expresada en mg y actividad de fosforilante expresada en d. p. m. de derivados fosforilados.

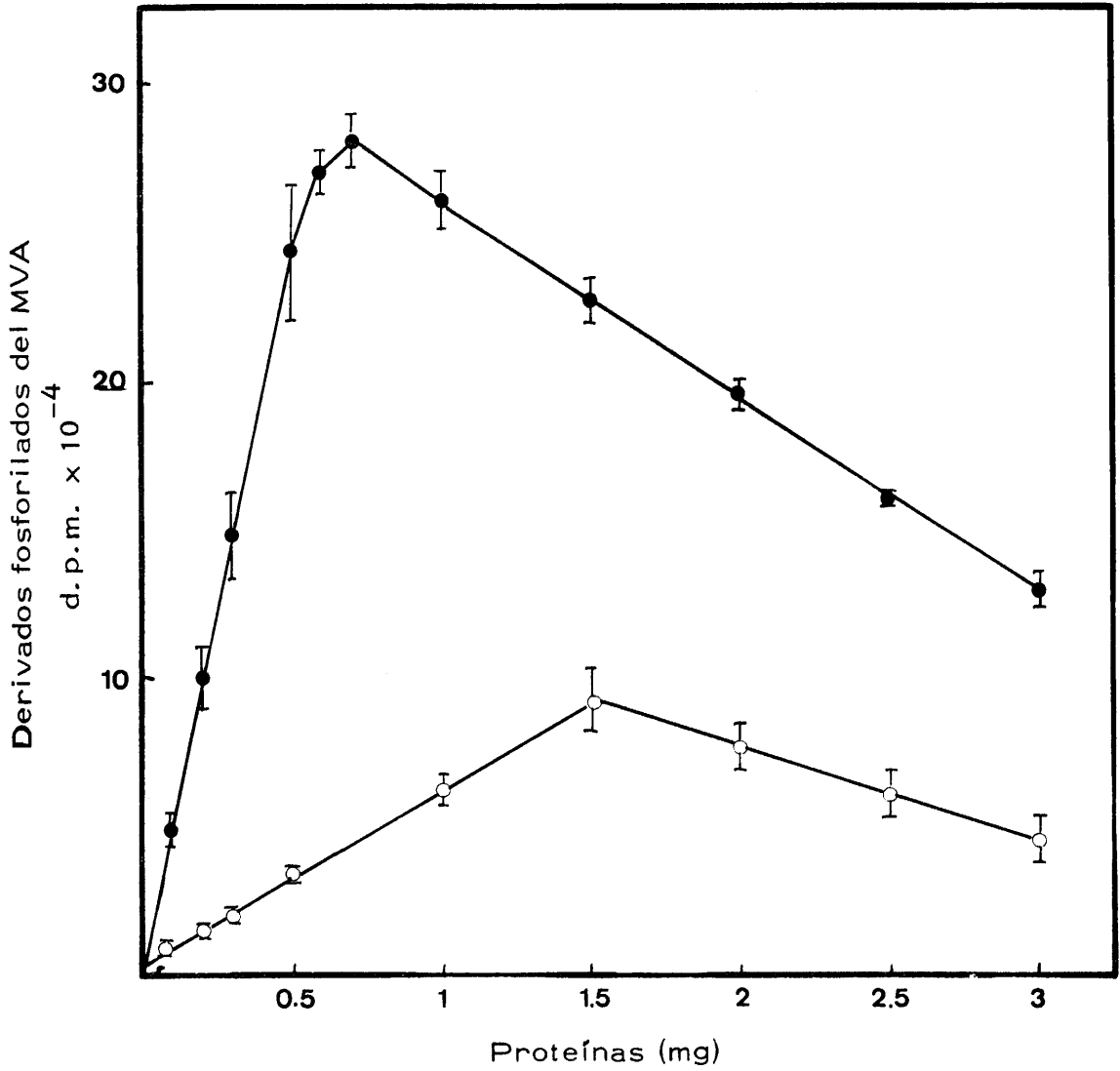
Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos enzimáticos a 37°C durante 30 minutos en presencia de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM)-Cl₂Mg. 6 H₂O (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 μM, 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. La concentración protéica de los extractos osciló entre 0 y 3 mg de proteína.

Los resultados de estas experiencias quedan representados en la Figura nº 14 en la que se puede apreciar una rápida bajada de actividad a partir de los 0.75 mg de proteína y donde también se aprecia que la zona exponencial de la curva está comprendida entre 0 y 0.5 mg de proteína para el P-MVA y entre 0 y 1.5 para el PP-MVA.

3. 2. 2. 2. - Influencia del tiempo de incubación de las reacciones

Se estudió la influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la producción de ácido fosfomevalónico y ácido pirofosfomevalónico.

Figura nº 14



Influencia de la concentración de proteínas de extractos libres de células de riñón de pollo, sobre la formación de de rivados del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado - (○). PP-MVA observado.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando a 37°C y en medio de tampón Tris-maleato pH 7.5 0.05 M (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2- ^{14}C (33.3 μM y 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml. durante 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min.

Como se puede observar en la Figura nº 15 la cantidad de fosfomevalónico aumenta linealmente hasta los 30 minutos de incubación de los 30 a los 60 minutos baja la actividad y a partir de los 60 min prácticamente se mantiene constante.

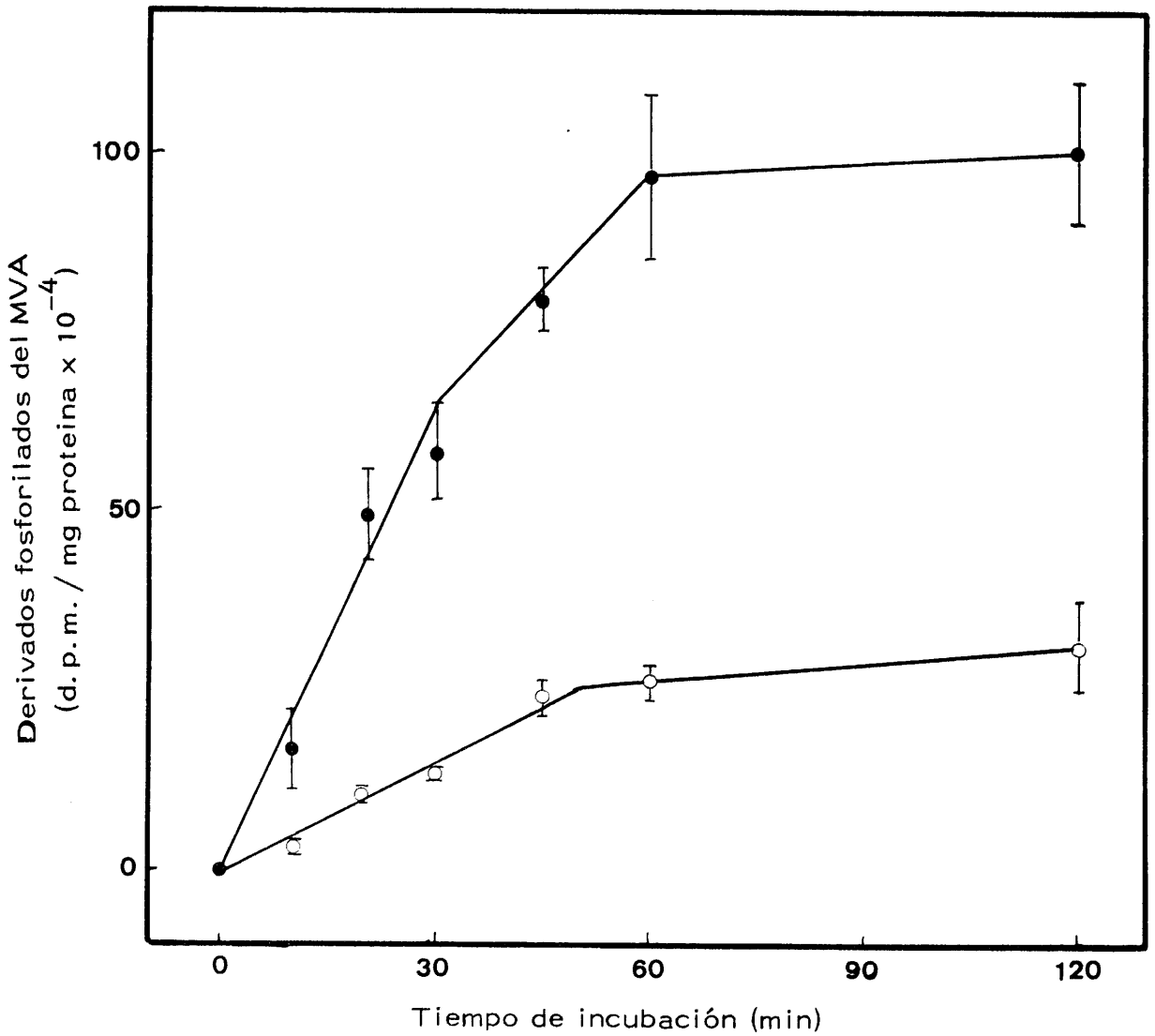
En cuanto la formación de pirofosfomevalónico puede apreciarse que es lineal hasta los 50 minutos de incubación a partir de los cuales se mantiene casi constante.

3.2.2.3. - Efecto del pH sobre la formación de derivados fosforilados del MVA

Se ha estudiado la variación de las actividades específicas dentro de un intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 9.5. El medio era de tampón Tris-maleato 0.05 M y pH correspondiente (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4mM), ATP (8 mM) y MVA -2- ^{14}C (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 0.5 ml.

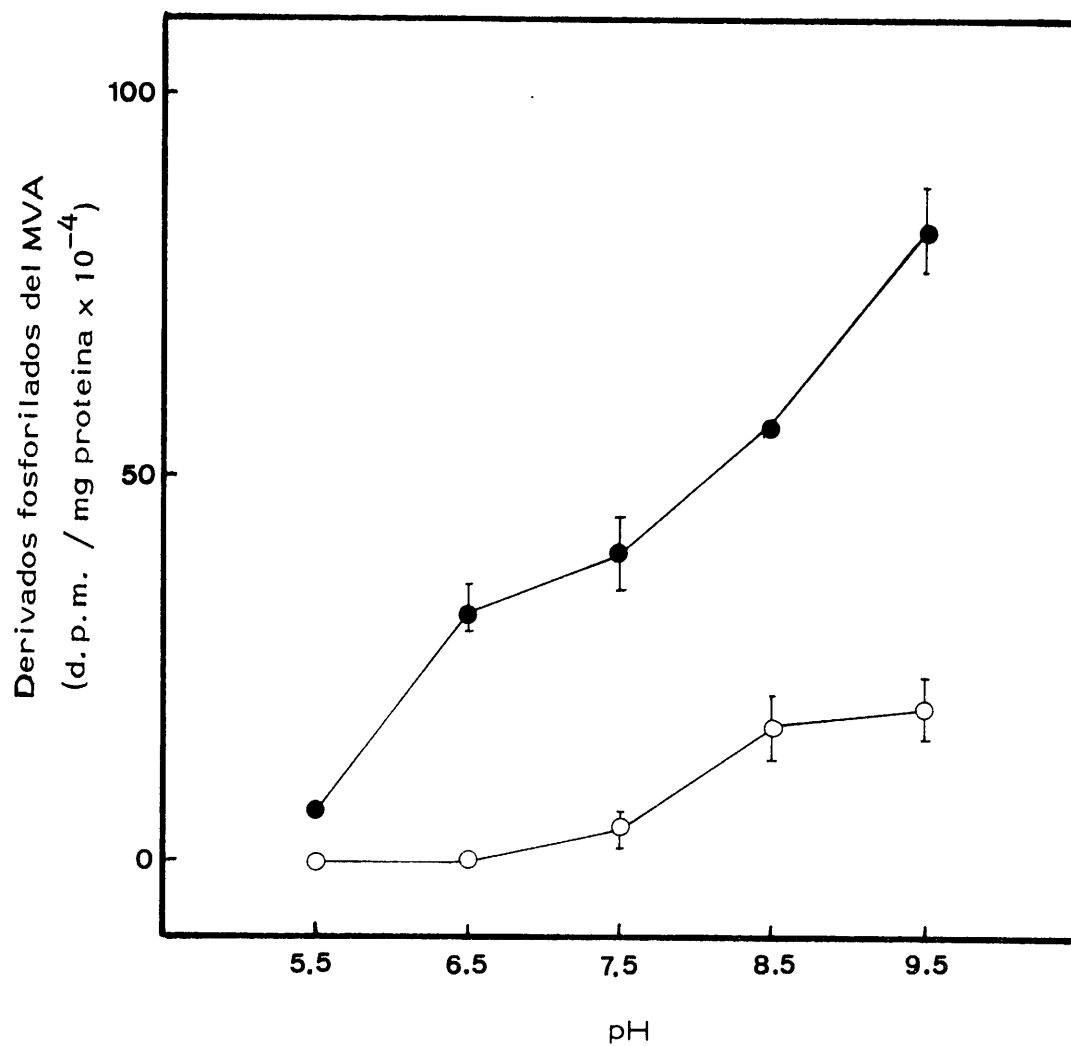
La Figura nº 16 muestra los resultados de este experimento, observándose que tanto la cantidad de P-MVA como la de PP-MVA aumenta al aumentar el pH dentro del margen ensayado alcanzándose las cantidades mayores de ambos derivados fosforilados a pH 9.5.

Figura nº 15



Influencia del tiempo de incubación de las reacciones enzimáticas sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. (●) P-MVA observado, (○) PP-MVA observado

Figura nº 16



Efecto del pH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA observado (○) PP-MVA observado.

3. 2. 2. 4. - Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico

Con objeto de estudiar la compartimentación de la fosforilación del ácido mevalónico dentro de la célula se hicieron reacciones enzimáticas utilizando como extractos enzimáticos las distintas fracciones subcelulares.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando la mezcla reactiva estandar a 37° durante 30 min.

Los resultados expresados en la Tabla X demuestran que ambas actividades enzimáticas mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa se localizan en la fracción citoplasmática, sobrenadante de 105.000 x g.

3. 2. 2. 5. - Estabilidad térmica de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa

Los extractos enzimáticos se incubaron a 50°C y 65°C a diferentes tiempos en un intervalo entre 0 y 60 min. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los extractos precalentados en medio de tampón Trís-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) Cl₂Mg (4 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 μM, 0.5 μci) en un volumen final de 1.5 ml.

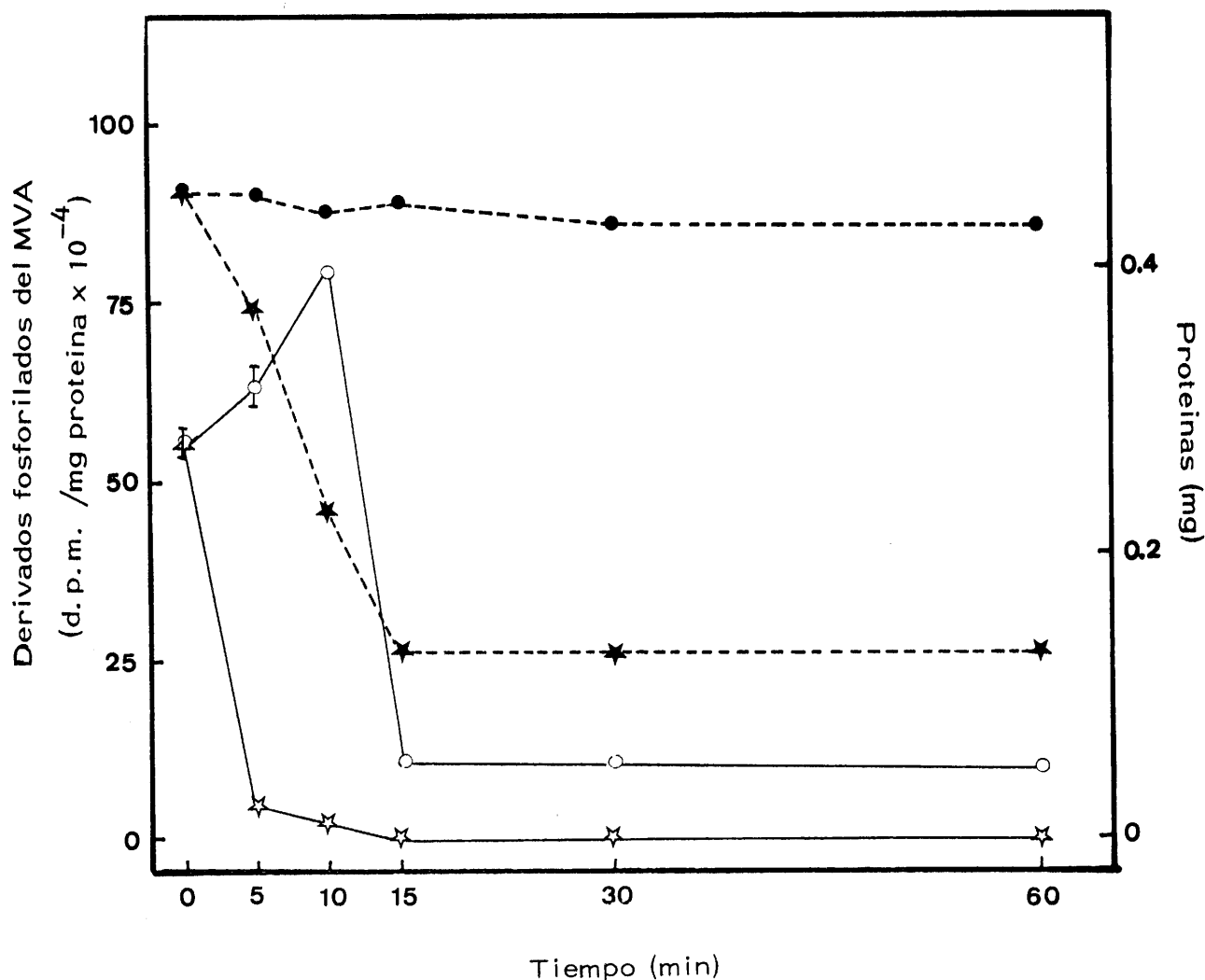
Los resultados obtenidos de estas reacciones enzimáticas representados en la Figura nº 17 muestran la inactivación total de la mevalonato cinasa al ser sometida a 65°C durante 15 min. mientras

TABLA X

Distribución intracelular de las enzimas fosforilantes del MVA, por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de seis experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

	Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
	P - MVA	PP - MVA
Extracto libre de células	22.7 \pm 0.8	0.0
Sobrenadante 15.000 xg	45.9 \pm 3.0	3.0 \pm 0.1
Precipitado 15.000 xg	0.0	0.0
Sobrenadante 105.000 xg	86.4 \pm 2.8	3.3 \pm 0.2
Precipitado 105.000 xg	0.0	0.0

Figura nº 17



Estabilidad térmica de las enzimas fosforilantes del MVA. Efecto de la preincubación a distintas temperaturas de extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Los puntos unidos con líneas continuas representan la cantidad de P-MVA observado tras el mantenimiento de los extractos a 50°C (○) y a 65°C (☆). Los puntos unidos con líneas discontinuas representan la concentración protéica de los extractos tras la preincubación de los mismos a 50°C (●) y a 65°C (★).

que el tratamiento del extracto enzimático a 50°C origina un considerable aumento en la actividad de mevalonato cinasa para bajar rápidamente a los 10 min. de preincubación.

Tanto la preincubación a 50°C como a 65°C origina la total inactivación de la fosfomevalonato cinasa.

3. 2. 2. 6. - Efecto de los nucleotidos

Se ha estudiado el requerimiento nucleotídico de las enzimas fosforilantes del MVA, de riñón de pollo, para ello se hicieron reacciones enzimáticas con ATP, ITP, UTP y GTP a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM en un medio de tampón Tris-maleato 0.05 M, pH 7.5 (40 mM) $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), MVA-2- ^{14}C (33.3 μM y 0.5 μci).

Los resultados expresados en la Tabla XI muestran la absoluta necesidad de suplementación nucleotídica para la actividad tanto de la mevalonato cinasa como de la fosfomevalonato cinasa. Por otra parte puede observarse que es el ATP el nucleótido con el que se alcanza la máxima actividad mevalonato cinasa seguido del ITP, siendo las cantidades de P-MVA formado con UTP y GTP muy pequeñas. Para la formación de PP-MVA es también el ATP el nucleótido mas efectivo, seguido del UTP con gran diferencia, sin embargo con el ITP y GTP no se obtiene PP-MVA alguno.

TABLA XI

Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos, excepto los nucleótidos cuya concentración final fué indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d.p.m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Nucleótido	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
		0.0	0.0
ATP	0.1	17.7 \pm 2.8	6.1 \pm 1.2
	0.5	49.4 \pm 10.6	28.9 \pm 9.1
	1.0	64.1 \pm 10.2	37.4 \pm 8.7
	5.0	129.1 \pm 11.0	40.3 \pm 10.8
	10.0	126.2 \pm 10.1	14.4 \pm 3.6
ITP	0.1	0.0	0.0
	0.5	16.7 \pm 4.7	0.0
	1.0	40.3 \pm 4.3	0.0
	5.0	59.1 \pm 11.6	0.0
	10.0	68.7 \pm 7.7	0.0
UTP	0.1	0.0	5.9 \pm 1.2
	0.5	0.0	4.6 \pm 0.2
	1.0	5.9 \pm 1.2	4.6 \pm 0.2
	5.0	9.2 \pm 0.5	4.5 \pm 0.4
	10.0	6.7 \pm 1.8	4.5 \pm 0.4
GTP	0.1	0.0	0.0
	0.5	4.6 \pm 0.2	0.0
	1.0	7.5 \pm 1.3	0.0
	5.0	0.0	0.0
	10.0	0.0	0.0

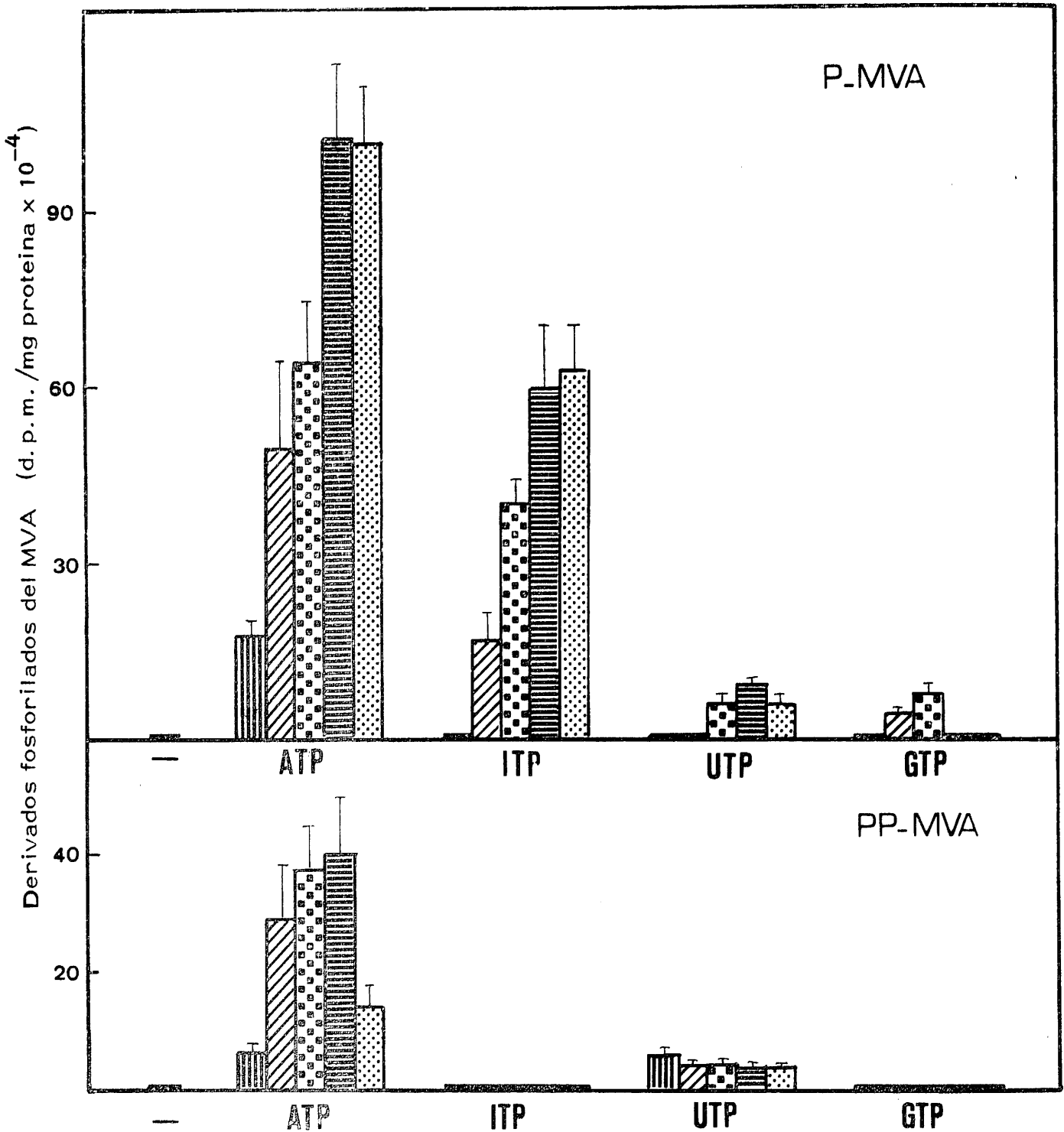
La formación de P-MVA aumenta a medida que aumenta la concentración de ATP para el que alcanza el máximo a 5.0 y 10.0 mM e ITP para el que alcanza el máximo a 10.0 mM (Fig. nº 18). Sin embargo la cantidad de PP-MVA observado llega al máximo con una concentración de ATP 5.0 mM, bajando mucho con una concentración de 10.0 mM.

3. 2. 2. 7. - Efecto de los cationes divalentes

La necesidad de la presencia de iones metálicos divalentes se puso de manifiesto en experiencias en las que el medio de reacción compuesto de tampón Tris-maleato 0.05 M pH 7.5 (40 mM), ATP (8 mM) y MVA-2-¹⁴C (33.3 µM 0.5 µci) se suplementó con Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺ a las concentraciones finales de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM; el volumen final de la reacciones fué de 1.5 ml.

Los resultados reflejados en la Tabla XII indican en primer lugar la inactividad total de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa cuando el medio de reacción no se suplementa con ion metálico alguno. En segundo lugar puede observarse que tanto el P-MVA como el PP-MVA aparecen en mayor cantidad cuando se añade Mg²⁺ y Mn²⁺ siendo más efectivo el Mn²⁺; las cantidades de P-MVA cuando se suplementa el medio de reacción con Ca²⁺ y Zn²⁺ son muy pequeñas y las de PP-MVA nulas a todas las concentraciones ensayadas.

Con Hg²⁺ la inactivación de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa fué total.



Efecto de los nucleótidos ATP, ITP, UTP y GTP sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los nucleótidos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (//), 0.5 mM (|||), 1.0 mM (•••), 5.0 mM (≡), 10.0 mM (■). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

TABLA XII

Efecto de algunos cationes divalentes sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos excepto los iones metálicos cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

		Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)	
Ión metálico	Concentración (mM)	P - MVA	PP - MVA
		0.0	0.0
Mg ²⁺	0.1	14.2 \pm 2.2	0.0
	0.5	24.8 \pm 2.4	0.0
	1.0	35.7 \pm 0.8	0.0
	5.0	95.5 \pm 5.2	11.9 \pm 0.6
	10.0	102.1 \pm 4.9	4.8 \pm 1.2
Mn ²⁺	0.1	55.9 \pm 10.4	0.0
	0.5	147.4 \pm 7.9	0.0
	1.0	169.0 \pm 12.1	0.0
	5.0	170.4 \pm 6.9	8.1 \pm 3.1
	10.0	70.5 \pm 12.5	3.9 \pm 1.1
Ca ²⁺	0.1	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0
	1.0	0.0	0.0
	5.0	15.7 \pm 0.7	0.0
	10.0	17.8 \pm 0.4	0.0
Zn ²⁺	0.1	32.1 \pm 2.3	0.0
	0.5	30.0 \pm 0.0	0.0
	1.0	29.8 \pm 3.0	0.0
	5.0	17.2 \pm 0.8	0.0
	10.0	0.0	0.0

Además se observa que el P-MVA formado aumenta cuando aumenta la concentración de Mg^{2+} alcanzando la máxima cantidad a la concentración de 10.0 mM mientras que el Mn^{2+} tienen una fuerte inhibición a la concentración de 10.0 mM, alcanzando su máxima cantidad de P-MVA observado a la concentración de 5.0 mM. El PP-MVA muestra su máxima formación a concentración de 10.0 mM mientras que el Mn^{2+} tiene una fuerte inhibición a la concentración de 10.0 mM alcanzando su máxima cantidad de P-MVA observado a la concentración de 5.0 mM. El PP-MVA muestra su máxima formación a concentración 10.0 mM para ambos cationes divalentes. (Fig. nº 19)

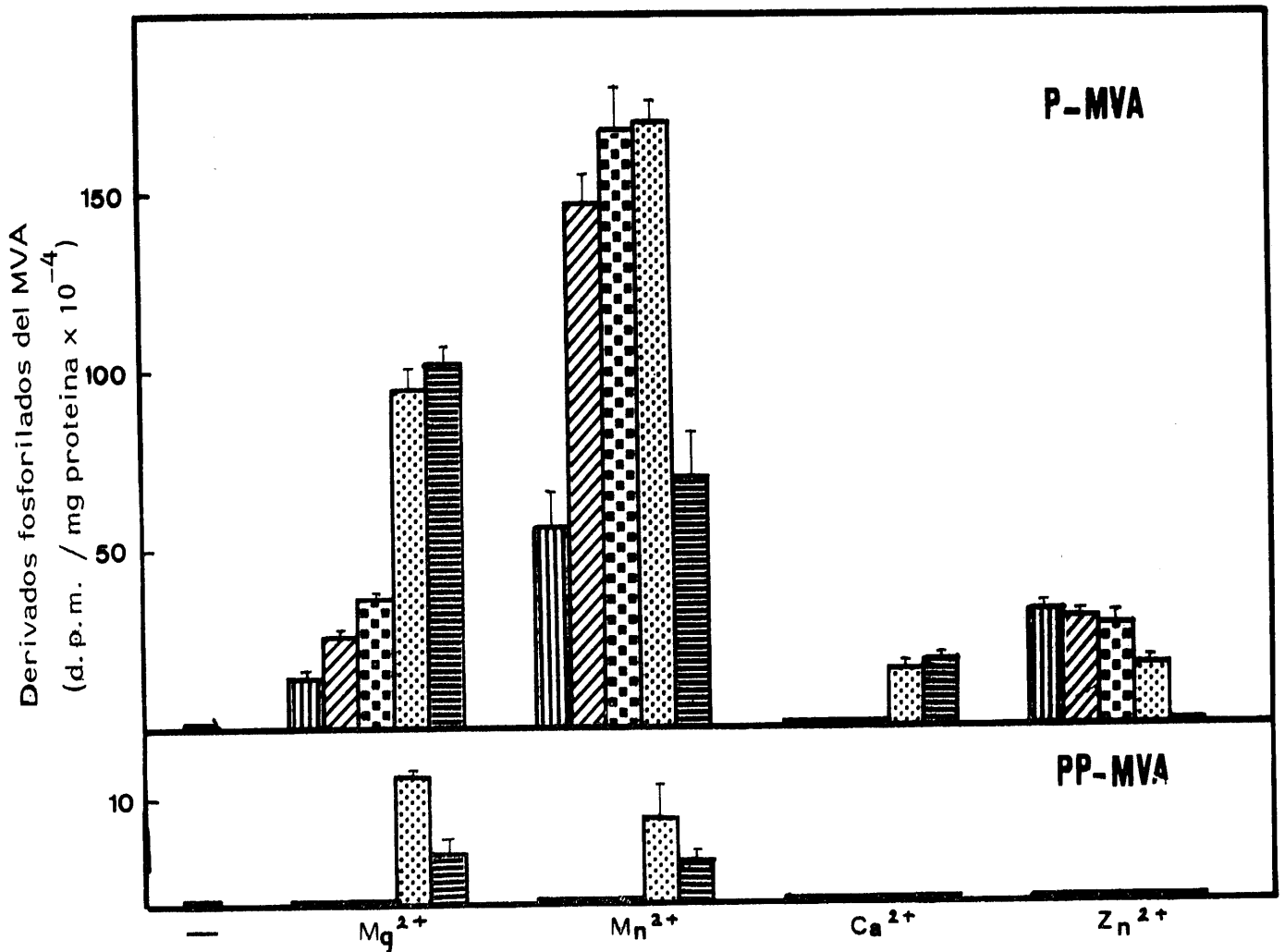
3. 2. 2. 8. - Efecto de algunos protectores de grupos -SH

Se ha estudiado la actividad de las enzimas fosforilantes de MVA en presencia de algunos protectores de grupos -SH (ditiotreitól, glutatión, cisteína y mercaptoetanol) a concentraciones 0.1, 1.0 y 10.0 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37°C, durante 30min el extracto enzimático de riñón de pollo junto con Tampón Trfs-maleato 0.05 M, pH 7.5, $Cl_2 Mg \cdot 6H_2O$ (4 mM), ATP (8 mM) y MVA $-2-^{14}C$ (33.3 μM , 0.5 μci) con un volumen final de 1.5 ml

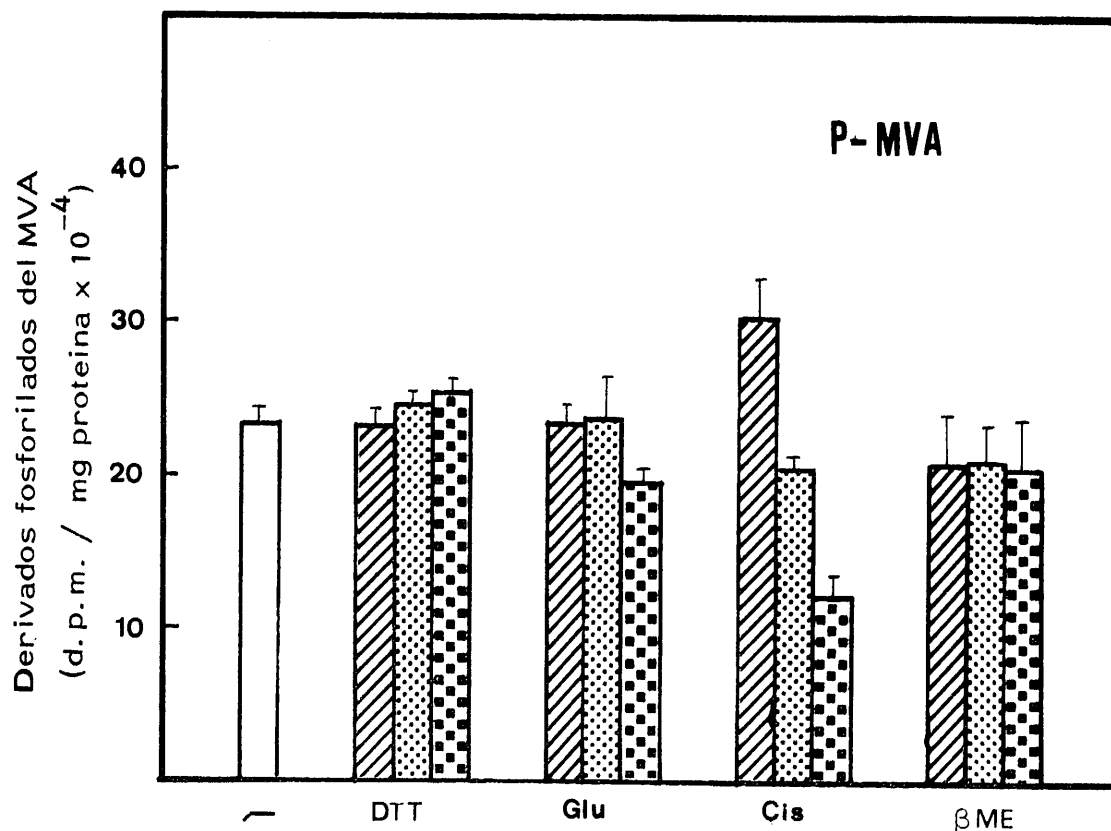
Como se observa en la Fig. nº 20 ninguno de los protectores de grupos -SH ensayados tiene un efecto activador sobre la mevalonato cinasa, incluso puede apreciarse una pequeña inhibición significativa con cisteína 10.0 mM (Tabla XIII). Con DTT y βME la actividad

Figura nº 19



Efecto de los cationes divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los iones metálicos en el medio de reacción fué: 0.1 mM (||||), 0.5 mM (///), 1.0 mM (■), 5.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 20



Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los protectores suplementados fué: 0.1 mM (//), 1.0 mM (•••) y 10.0 mM (◻◻). los resultados se expresan como la media de tres experiencias Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

TABLA XIII

Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el protector cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

(d. p. m. /mg proteína 10^{-4})					
Protector	Concentración (mM)	Nº exp.	P-MVA	t	p
—	—	3	23.1 \pm 2.5		
Ditiotreitol	0.1	3	23.1 \pm 3.0	0.0	<0.9
	1.0	3	24.5 \pm 1.8	0.4	<0.5
	10.0	3	25.3 \pm 1.5	0.7	<0.5
Glutation	0.1	3	23.1 \pm 1.3	0.0	<0.9
	1.0	3	23.8 \pm 3.2	0.17	<0.9
	10.0	3	19.5 \pm 1.1	1.3	<0.2
Cisteina	0.1	3	30.3 \pm 2.3	2.0	<0.1
	1.0	3	20.6 \pm 1.0	0.8	<0.5
	10.0	3	12.2 \pm 1.4	3.7	<0.02
Mercaptoetanol	0.1	3	20.9 \pm 3.5	0.5	<0.5
	1.0	3	20.9 \pm 2.8	0.5	<0.5
	10.0	3	20.8 \pm 3.0	0.5	<0.5

se mantienen prácticamente igual a los controles, con Glutathion hay una pequeña inhibición no significativa a la concentración 10.0 mM y con cisteína hay un pequeño aumento no significativo seguido de inhibición a 5.0 mM y 10.0 mM, siendo significativa la inhibición a 10.0 mM como ya se ha indicado.

A ninguna de las concentraciones ensayadas de protectores de grupos -SH se observó formación de PP-MVA

3.2.2.9. - Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH

Se hicieron las mismas experiencias que en el apartado anterior, pero añadiendo en lugar de protectores, inhibidores de grupos -SH (n-etil-maleimida, p-hidroximercuribenzoato y 5,5'-ditiobis nitrobenzoico) a concentraciones 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mM.

La Tabla XIV muestra la existencia de inhibición total para el p-hidroximercuribenzoato a partir de 0.1 mM y de una inhibición significativa (50%) con el 5,5'-ditiobisnitrobenzoico a partir de 1.0 mM.

La n-etil-maleimida no ejerce inhibición ninguna e incluso a 1.0 mM aumenta un poco la actividad con respecto a los controles (Fig. nº 21).

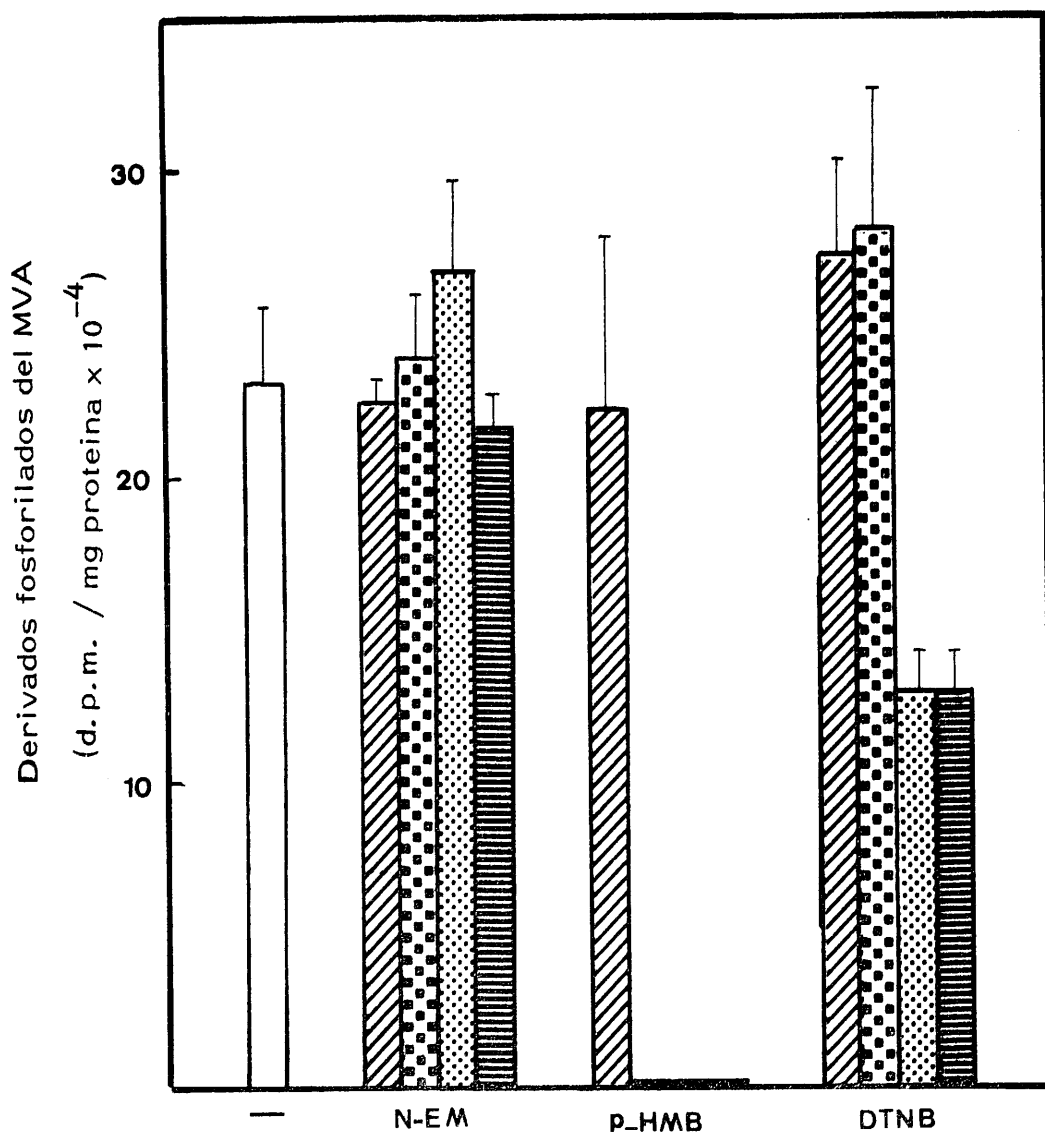
En presencia de los tres inhibidores ensayados a cualquiera de las concentraciones, no se observó ninguna formación de PP-MVA

TABLA X IV

Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando los extractos con la mezcla estandar de los reactivos suplementada con el inhibidor cuya concentración final fué la indicada en la tabla. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

P-MVA					
Inhibidor	Concentración (mM)	Nº exp.	d. p. m. /mg proteína 10^{-4}	t	p
—	—	3	23.1 ± 2.5		
N-etil-maleimida	0.01	3	22.0 ± 0.3	0.2	<0.5
	0.1	3	23.9 ± 2.1	0.2	<0.5
	1.0	3	26.7 ± 3.0	0.9	<0.3
	10.0	3	21.6 ± 1.1	0.5	<0.5
p-hidroximercuri-benzoato	0.01	3	22.3 ± 5.5	0.1	<0.9
	0.1	3	0.0		
	1.0	3	0.0		
	10.0	3	0.0		
5,5'-ditiobis-nitrobenzoico	0.01	3	27.4 ± 3.1	1.0	<0.3
	0.1	3	28.1 ± 4.3	0.9	<0.3
	1.0	3	13.0 ± 1.2	3.6	<0.05
	10.0	3	13.0 ± 1.2	3.7	<0.05

Figura nº 21



Efecto de algunos inhibidores de grupos -SH sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. La concentración final de los inhibidores suplementados fué 0.01 mM (//), 0.1 mM (■) 1.0 mM (●) y 10.0 mM (≡). Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

3. 2. 2. 10. - Influencia de la edad del pollo

Se estudió la incorporación de MVA a P-MVA y PP-MVA a lo largo del desarrollo postnatal del pollo (de 0 a 10 días)

Las reacciones se llevaron a cabo incubando con la mezcla reactiva estandar, los extractos de riñón de pollo de las distintas edades a 37 °C durante 30 min. Como puede apreciarse en la Figura nº 22 se observó cantidades superiores de P-MVA de los 0 a los 4 días, con bastante diferencia, con las edades de 5 a 10 días de actividades aproximadamente 3 veces inferiores a las edades anteriormente citadas. Para el PP-MVA puede apreciarse una subida en las edades de 1, 2 y 3 días, siendo para el resto de las edades muy pequeña la actividad con una ligera tendencia a subir a partir del 6º día.

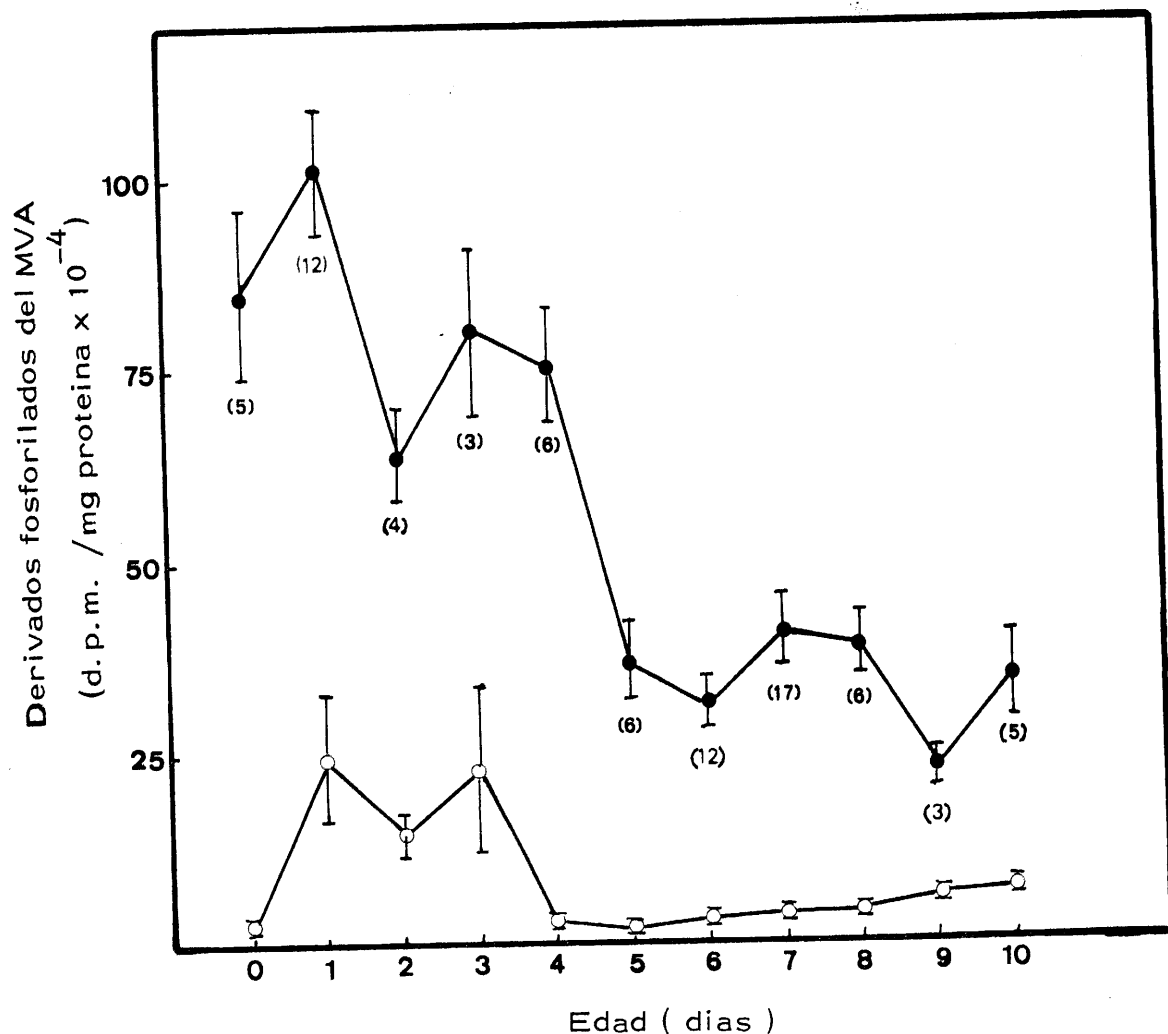
3. 2. 2. 11. - Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta.

Se hicieron las mismas experiencias descritas en el apartado 3. 2. 1. 11 con objeto de ver el efecto producido por la dieta de colesterol sobre la fosforilación del MVA por extractos de riñón de pollo.

En la Tabla nº XV se expresa las cantidades de P-MVA que son prácticamente iguales en los pollos controles que en los tratados.

En la segunda serie de experiencias se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla XVI en la que puede verse que tanto los pollos controles como los tratados tienen la misma cantidad de derivados fosforilados. Demostrándose así que, al menos en las edades estudiadas

Figura nº 22



Influencia de la edad sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Los resultados se expresan como la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representan el error estandar de la media (●) P-MVA (○) PP-MVA.

TABLA XV

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

		P - MVA observado (d.p.m. / μg proteína $\times 10^{-4}$)		
Edad (días)	horas de tratamiento	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p
6		72.5 \pm 6.1		
7	24	52.5 \pm 9.3	75.6 \pm 9.0	< 0.2
8	48	44.5 \pm 2.5	44.6 \pm 2.4	< 0.9
9	72	60.0 \pm 2.9	64.4 \pm 5.2	< 0.9

TABLA XVI

Influencia de la dieta de colesterol sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. Los días que corresponden a la edad, corresponden también a tiempo de tratamiento con dieta de colesterol. El \pm representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. /mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA				PP - MVA		
Edad (días)	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	p	Controles (dieta normal)	Tratados (dieta 5% colesterol)	P
6	18.2 \pm 2.0	20.7 \pm 2.3	< 0.01	8.7 \pm 0.0	3.1 \pm 0.2	< 0.3
7	15.2 \pm 0.6	14.8 \pm 6.1	< 0.9	0.0	0.0	
8	38.1 \pm 5.7	35.3 \pm 1.3	< 0.5	5.7 \pm 0.7	5.8 \pm 0.6	< 0.9
9	23.9 \pm 1.6	22.2 \pm 2.3	< 0.3	5.7 \pm 0.7	5.9 \pm 0.6	< 0.5
10	29.9 \pm 3.0	35.3 \pm 9.1	< 0.1	5.5 \pm 0.2	8.0 \pm 2.0	< 0.2

la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa de riñón de pollo no tienen inhibición feed-back por colesterol.

3. 2. 2. 12. - Influencia del ayuno

Se ha estudiado la posible influencia del ayuno sobre la fosforilación del MVA por extractos libres de células de riñón de pollo. Se hicieron las mismas experiencias que en el apartado 3. 2. 1. 12 cuyos resultados quedan expresados en la Tabla XVII. Tanto los pollos ayunados como los controles no muestran la misma cantidad de P-MVA y PP-MVA formado.

3. 2. 2. 13. - Influencia del ritmo luz- oscuridad

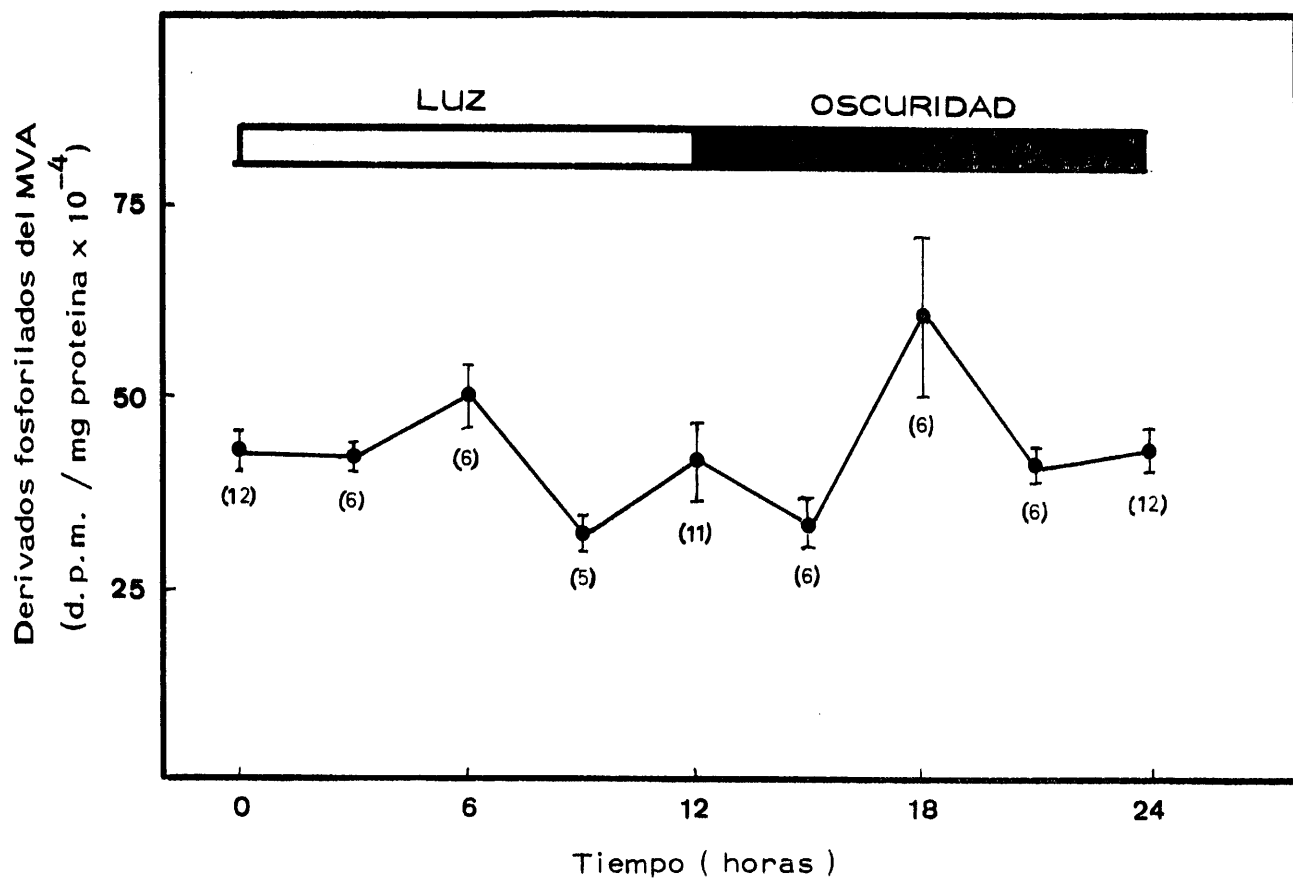
Con objeto de comprobar si las enzimas fosforilantes del MVA de riñón de pollo están influidos en su actividad por el ritmo luz-oscuridad se hicieron el tipo de experiencias descritas en el apartado 3. 2. 1. 13. cuyos resultados representados en la Figura nº 23 demostrando que las pequeñas variaciones obtenidas no son suficientes como para deducir la existencia de ritmo luz-oscuridad al menos en los primeros días del desarrollo postnatal del pollo.

TABLA XVII

Influencia del ayuno sobre la formación de derivados fosforilados del MVA en extractos libres de células de riñón de pollo. El \pm representa el error estandar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

Derivados fosforilados del MVA observados (d. p. m. / mg proteínas $\times 10^{-4}$)						
P - MVA			PP - MVA			
horas de ayuno	Controles	Ayunados	p	Controles	Ayunados	p
24	38.1 \pm 5.7	41.5 \pm 4.2	< 0.5	5.7 \pm 0.7	6.7 \pm 0.8	< 0.3
48	23.9 \pm 1.6	25.7 \pm 2.5	< 0.5	5.7 \pm 0.7	6.8 \pm 0.8	< 0.3

Figura nº 23



Influencia del ritmo circadiano sobre la fosforilación del MVA por extracto libres de células de riñón de pollo con la media del número de experiencias indicado entre parentesis. Las líneas verticales representa el error estandar de la media. (●) P-MVA

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It then proceeds to describe the methodology used, including the data collection and analysis techniques. The results of the study are presented in the following section, followed by a discussion of the findings and their implications. The paper concludes with a summary of the main points and a list of references.

IV. - DISCUSSION

IV. - DISCUSION

Las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico constituyen un cauce común mediante el cual este ácido va a dar lugar al isopentenil pirofosfato, unidad básica de cinco átomos de carbono, de la cual van a derivar los diferentes compuestos bioquímicos conocidos genéricamente con el nombre de compuestos isoprenoides. La primera hipótesis sobre la biosíntesis de los isoprenoides se debe a Ruzicka (156), quien en 1953 supuso ya un papel fundamental para el isopentenil pirofosfato. Su formación ocurre a través de los dos derivados fosforilados del ácido mevalónico: fosfomevalónico y pirofosfomevalónico, originados en sendas reacciones enzimáticas catalizadas, respectivamente, por la mevalonato cinasa y por la fosfomevalonato cinasa. La distribución universal de esta ruta biosintética hace que estas enzimas hayan sido estudiadas en diversos orígenes. Aunque su funcionamiento en aves era previsible, no se había intentado aun poner de manifiesto las posibles particularidades de estas reacciones. En este sentido, comenzamos en nuestro Departamento el estudio de la fosforilación "in vitro" del ácido mevalónico por preparaciones enzimáticas de hígado de pollo durante los primeros días de su desarrollo postnatal, estudio que hemos completado en el presente trabajo mediante el reconocimiento de la contribución que, otros dos órganos como el cerebro y el riñón, presentan al funcionamiento de la mencionada ruta biosintética.

En efecto, el papel del cerebro en la biosíntesis de los derivados isoprenoides, y más concretamente del colesterol, está ilu-

mado a ser fundamental habida cuenta de que la mielina contiene colesterol, fosfatidil derivados, cerebrosidos y esfingomielina en una proporción molar aproximada de 10: 8 : 3: 1.

Por otra parte, el hecho de que en rata más de la mitad del mevalónico incorporado mediante el llamado "shunt" a compuestos no esteroídicos sea metabolizado por el riñón, hace de este órgano un instrumento fundamental para el estudio del metabolismo del ácido mevalónico, y más concretamente, de sus reacciones de fosforilación, etapas comunes para la síntesis de compuestos isoprenoides y no isoprenoides.

Los primeros trabajos a realizar dentro del tema propuesto consistían en poner de manifiesto las actividades enzimáticas en reacciones llevadas a cabo "in vitro", mediante el reconocimiento y medida de los productos formados en las mismas a partir del ácido mevalónico. Este compuesto comercializado con marcaje isotópico en los carbonos nº 1 ó nº 2, constituyen en instrumento apropiado para su utilización como sustrato de las reacciones en estudio, ya que sus derivados fosforilados aparecerán también marcados en los mismos átomos de carbono. Por otra parte, cuando el MVA-1-¹⁴C se usa como sustrato, solo aparecerán marcados los derivados P-MVA y PP-MVA, mientras que el producto de la siguiente reacción, el isopentenil pirofosfato, no tendrá en su molécula átomo alguno de ¹⁴C, por haberse eliminado el que ocupaba la posición nº 1 del sustrato en la reacción de descarboxilación que ha conducido al mismo. Sin embargo, cuando el sustrato es el MVA-2-¹⁴C, el isopentenil

pirofosfato también aparece marcado, lo cual permite su identificación radioisotópica.

El sistema comúnmente utilizado para la identificación de los derivados del MVA es la cromatografía en papel, empleando diversos líquidos de desarrollo. Cada uno de estos presenta ciertas particularidades sobre los productos de las reacciones enzimáticas, por lo que, tras un amplio trabajo realizado anteriormente en nuestro Departamento (157) hemos seleccionado el más ventajoso para la identificación del P-MVA y del PP-MVA estableciéndose las condiciones en que se reducen al mínimo las posibles reacciones de hidrólisis que pueden afectar al significado de los resultados obtenidos.

En todas las experiencias recogidas en la presente Memoria solo se han detectado, como productos de las reacciones enzimáticas, el P-MVA y el PP-MVA. La utilización del MVA-2-¹⁴C como sustrato hubiera permitido la visualización del isopentenil pirofosfato, caso de haberse originado. El hecho de que en ningún caso se ha detectado este compuesto con los valores de R_f señalados en la bibliografía para el mismo, hace pensar en una débil o nula actividad de la pirofosfomevalonato descarboxilasa en las condiciones en que se han llevado a cabo las reacciones "in vitro".

Asimismo hemos de destacar el hecho de que se han estudiado simultáneamente las reacciones catalizadas por la mevalonato cinasa y por la fosfomevalonato cinasa, ya que se ha utilizado como sustrato

Único el MVA, el cual resulta transformado en P-MVA por la primera de las enzimas mencionadas, sirviendo a su vez como sustrato de la segunda de las enzimas que lo transforma en PP-MVA. Esto lleva consigo el que la cantidad de P-MVA que se ha originado por acción de la mevalonato cinasa sea la observada cromatográficamente como tal, más la que se ha transformado en PP-MVA por acción de la fosfomevalonato cinasa. Aunque ambas actividades específicas deberían expresarse en moles ó μ moles de producto formado por mg de proteína enzimática, normalmente se expresan en d.p.m. por mg de proteína, si bien conviene tener en cuenta que la actividad mevalonato cinasa vendrá dada por la suma de las d.p.m. de P-MVA observado más las d.p.m. de PP-MVA, mientras que la actividad fosfomevalonato cinasa viene dada sólo por las d.p.m. de PP-MVA observado. Con objeto de simplificar los cálculos, los resultados recogidos en la presente Memoria se expresan en d.p.m. de cada uno de los derivados fosforilados, tal como se determinan radiocromatográficamente, resultados que son proporcionales y fácilmente transformados en nmoles dado que se conoce la radiactividad específica del MVA y, por tanto, de sus derivados fosforilados.

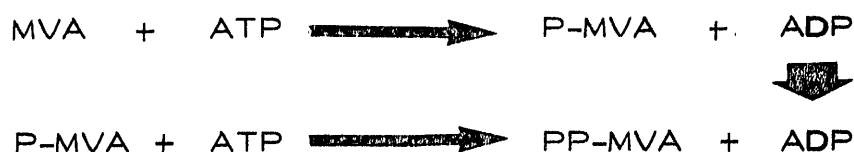
La observación de la cantidad de P-MVA y especialmente de PP-MVA originados en cada serie de experiencias pone de manifiesto una amplia variación numérica, variación que es debida principalmente a la distinta edad de los animales utilizados. En efecto, como veremos posteriormente, se ha demostrado que la edad de los pollos, entre 1-10 días, influyen poderosamente sobre la capacidad fosforilante del MVA tanto en el cerebro como en el riñón. El hecho de poder disponer en cualquier momento de animales comprendidos entre los límites de edad reseña-

dos nos facilitó la realización del presente trabajo, evitando la necesidad de utilizar siempre pollos de una misma edad, lo cual hubiera llevado consigo el trabajar solo en un determinado día de la semana, dada las características de la granja suministradora de los animales. En cualquier caso, los resultados presentados en esta Memoria son totalmente comparativos para cada serie de experiencias, lo cual nos ha permitido deducir las conclusiones correspondientes sobre la influencia de los diferentes efectores ensayados.

Una de las características observadas en todas las experiencias realizadas, tanto con preparaciones enzimáticas de cerebro como con las del riñón, es que la cantidad de P-MVA observado es muy superior a la de PP-MVA, lo cual parece indicar que, al menos en las condiciones utilizadas por nosotros, la actividad mevalonato cinasa es muy superior a la fosfomevalonato cinasa. La única ocasión en que parece formarse una cantidad elevada de PP-MVA es en presencia de bajas concentraciones de nucleótidos, especialmente ATP 0.5-1.0 mM.

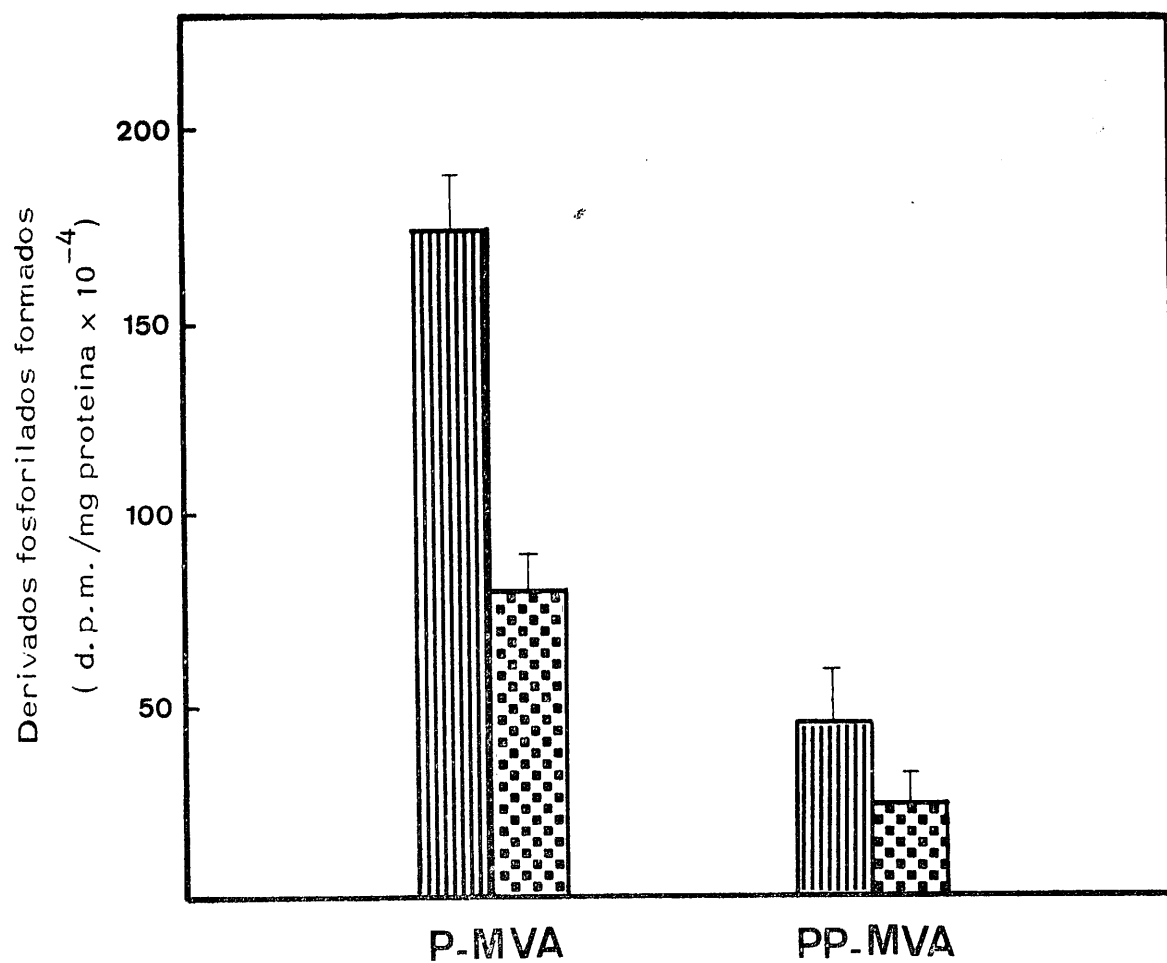
El carácter reversible de la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa y el hecho de estudiarse las dos reacciones de fosforilación conjuntamente podría significar el que una fuerte cantidad de ADP formado en la primera reacción de fosforilación desplazaría hacia la izquierda el equilibrio de la segunda, disminuyendo así la formación de

PP-MVA:



Uno de los primeros condicionantes para el estudio "in vitro" de las reacciones de fosforilación del MVA era establecer los límites de proporcionalidad entre la cantidad de producto o productos originados y la cantidad de proteína enzimática utilizada, y el tiempo de la reacción siempre que se mantuvieran constantes el sustrato y los efectores enzimáticos. La mayor actividad de las preparaciones de cerebro hace que la proporcionalidad se mantenga entre límites más estrechos, especialmente en cuanto a la cantidad de proteína enzimática adicionada, ya que solo existe la mencionada proporcionalidad hasta 0.2 mg de proteína, tanto para la formación de P-MVA como de PP-MVA, mientras que en riñón este límite es mucho mayor: 0.5 mg para el P-MVA y 1.5 mg para el PP-MVA. Asimismo es de destacar la mayor amplitud de los límites en que se mantiene la proporcionalidad para la formación de PP-MVA que de P-MVA, tanto en la cantidad de proteína enzimática usada como en el tiempo durante el cual se prolonga la reacción. Estos resultados especialmente patentes en el riñón, coinciden con los observados previamente en el hígado y podrían explicarse por la dependencia de la segunda reacción de fosforilación en cuanto a la formación de su sustrato, P-MVA, producto de la primera de las reacciones de fosforilación en estudio.

Figura nº 24



Diferencia en la cantidad de P-MVA y PP-MVA observados en extractos libres de células de cerebro (||||) y de riñón (■) de pollo de tres días de edad. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Contrariamente a lo observado en otros orígenes, la mevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo presenta un pH de actuación ligeramente ó francamente alcalino, ya que la máxima cantidad de fosfomevalónico se obtiene a pH 9.5 . Asimismo, aunque de una manera menos acusada, la cantidad de PP-MVA se incrementa a medida que lo hace el pH, dentro de los márgenes estudiados (5.5 - 9.5). Estos resultados difieren de los reseñados para ambas enzimas en otros animales, preferentemente mamíferos, en los que la mevalonato cinasa suele presentar la máxima actividad a pH 7-8, mientras que la fosfomevalonato cinasa se suele caracterizar por un amplio margen de pH en el cual presenta una actividad muy semejante.

En cuanto a la distribución intracelular, las enzimas estudiadas en cerebro y riñón de pollo son citoplasmáticas, aislandose fundamentalmente de la fracción sobrenadante de $105.000 \times g$. En este sentido, la localización de ambas enzimas coincide con la descrita en todos los orígenes animales (119) si bien en vegetales se ha observado también la existencia de isoenzimas de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa en el interior de los cloroplastos (158, 159, 160).

Como cosustrato de ambas reacciones se puede considerar al nucleótido, frente al cual los enzimas de cerebro y riñón de pollo presentan un requerimiento absoluto. Ello explica el hecho de que las reacciones llevadas a cabo sin suplementación de ningún nucleótido no originan cantidad alguna de P-MVA ni de PP-MVA. Entre los nucleótidos

ensayados el ATP es el más activo en ambos órganos, si bien el ITP también puede actuar como tal cosustrato aunque con mucha menor actividad. UTP y GTP son prácticamente inactivos. En este aspecto, las enzimas de cerebro y riñón de pollo coinciden con las de otros orígenes animales, si bien la de hígado de cerdo es casi igualmente activa con ITP que con ATP (114), y la de Sarcophaga bullata puede usar también ITP y UTP a pequeña concentración (120). Mientras que la mevalonato cinasa de hígado (163) resulta inhibida por altas concentraciones de ATP (10.0 mM), el riñón no parece afectarse por esta concentración, e incluso la de cerebro incrementa su actividad, si se compara con la obtenida a concentración 5.0 mM. Sin embargo, la cantidad de PP-MVA observado disminuye a medida que aumenta la concentración de nucleótidos, efecto que puede ser explicado por la acción del ADP tal como expresamos anteriormente.

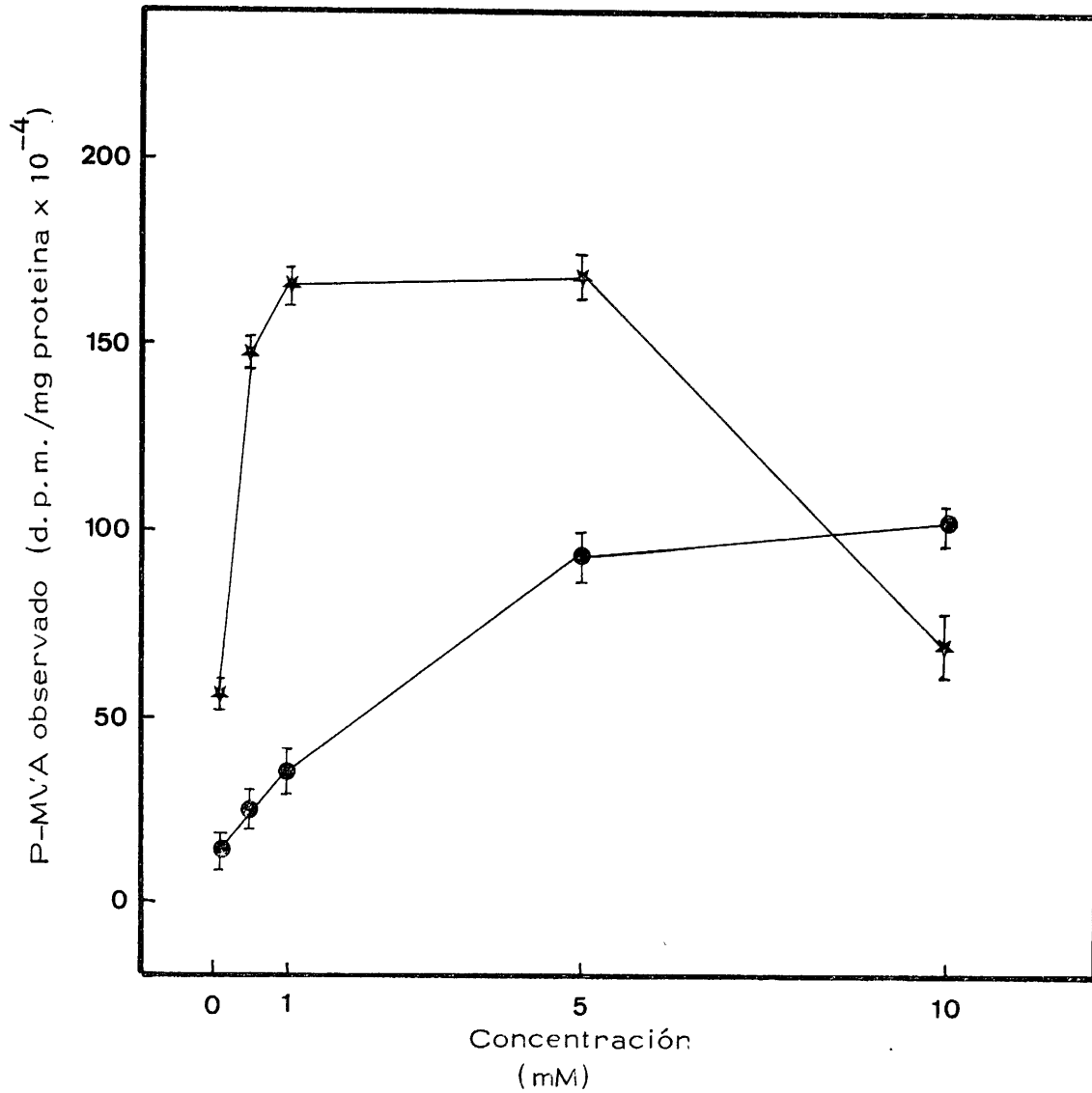
Tanto en el cerebro como en el riñón, la formación de P-MVA por extractos libres de células es mayor en presencia de Mn^{2+} que de Mg^{2+} a pequeñas concentraciones (0.1-1.0 mM). Este mejor funcionamiento del Mn^{2+} como ion activador de la mevalonato cinasa había sido descrito en otros orígenes, tanto animales como vegetales, (114, 135) y coincide asimismo con lo observado en el hígado de pollo (163). Ahora bien, mientras que el Mg^{2+} aumenta su actividad a medida que lo hace su concentración (10.0 mM), el Mn^{2+} ejerce una clara inhibición en ambos órganos, si bien a partir de diferente concentración, siendo muy clara la ejercida sobre la enzima de cerebro a partir de una concentración 1.0 mM, en cuyo aspecto recuerda a la enzima de hígado. Una inhibición

semejante por Mn^{2+} había sido encontrada en nuestro Departamento para la mevalonato cinasa parcialmente purificada de Agave americana (140) y también descrita en la enzima de hígado de cerdo (114) y latex de Hevea brasiliensis (130) (Figuras nº 25 y 26).

Otros iones ensayados como el Ca^{2+} ó el Zn^{2+} presentan solo una ligera capacidad fosforilante del MVA, mientras que, como era de esperar, los iones Hg^{2+} inhiben completamente a la mevalonato cinasa en los dos órganos estudiados.

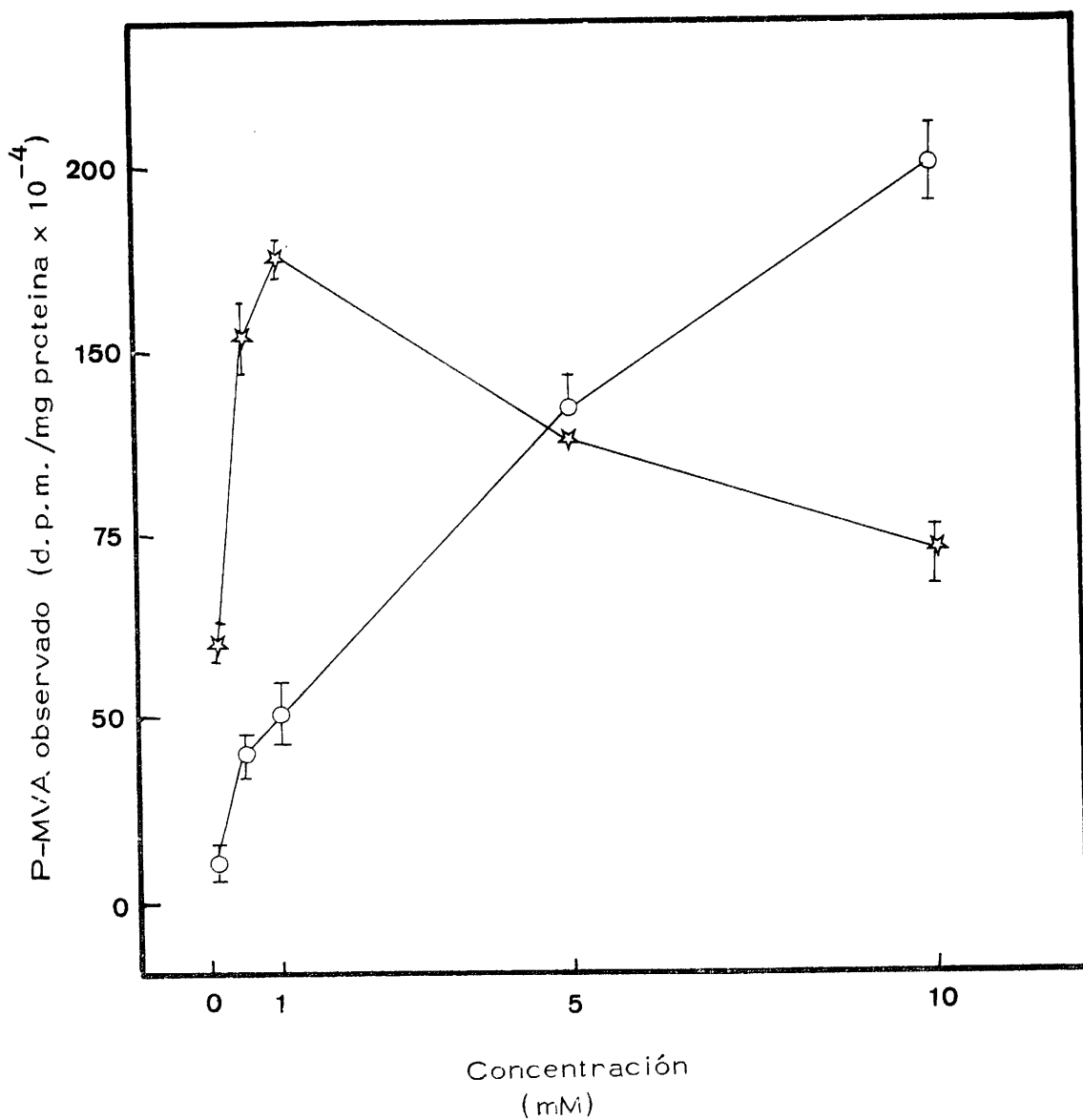
Esta inhibición ejercida por los iones Hg^{2+} parece estar en relación con la existencia de grupos $-SH$ en el centro activo de la enzima. En efecto, salvo la enzima de levadura (145) y de Hevea brasiliensis (130) que no precisan la suplementación de agentes protectores de grupos $-SH$ para la síntesis de compuestos isoprenoides a partir del MVA, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, todos los trabajos sobre este tema coinciden en señalar el efecto favorecedor de los agentes reductores y, en la mayoría de los casos su presencia resulta imprescindible. Todo ello es claro indicio de la presencia de algún grupo $-SH$ en el centro activo de la enzima. Sin embargo, las preparaciones enzimáticas de cerebro no requiere la adición de ningún agente protector de grupos $-SH$ para su actuación. Es más, la adición de DTT o de glutatión incluso disminuye la cantidad de P-MVA formado, cualquiera que sea la concentración a que se adiciona (0.1 - 10.0 mM). Otros protectores, como el β ME, no afectan prácticamente a la actividad mevalonato cinasa.

Figura nº 25



Efecto inhibitor del Mn^{2+} (★) a altas concentraciones; y efecto activador del Mg^{2+} (●) sobre la formación de P-MVA por extractos libres de células de riñon de pollo. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Figura nº 26



Efecto inhibitor del Mn^{2+} (☆) a altas concentraciones y efecto activador del Mg^{2+} (○) sobre la formación de P-MVA por tractos libres de células de cerebro de pollo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

En el caso del riñón, ninguno de los protectores a las concentraciones ensayadas parece afectar a la mevalonato cinasa. Tan solo la cisteína 10.0 mM inhibe claramente a la enzima, recordando en este aspecto a la misma enzima de hígado de pollo (163). Se trata pues, de un comportamiento distinto de la mevalonato cinasa de cerebro y de riñón, siendo solo esta última semejante a la de hígado, mientras que la de cerebro es mucho más sensible a los protectores de grupos -SH. Este efecto inhibitor no había sido descrito con anterioridad para enzimas fosforilantes del MVA.

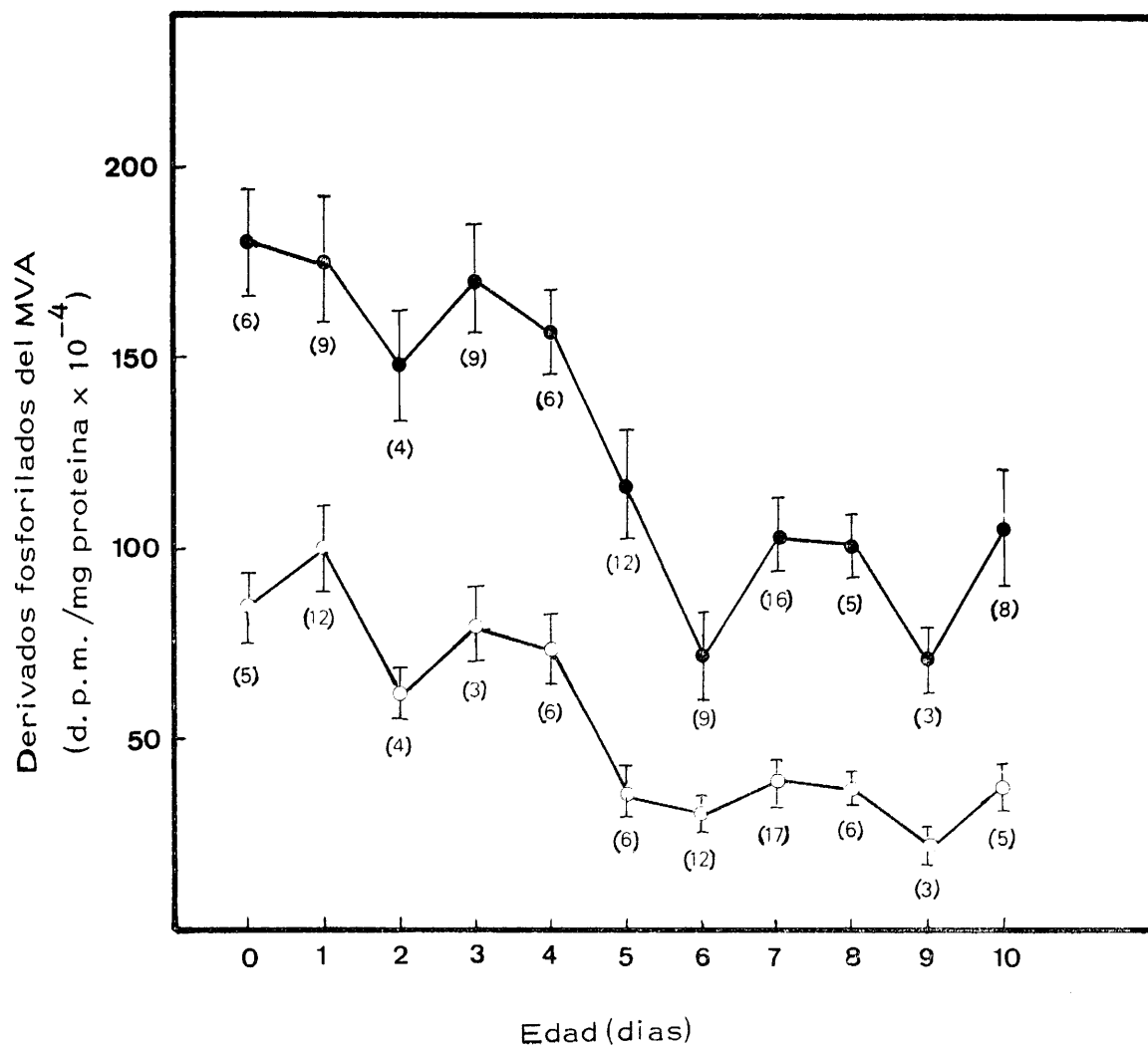
Sin embargo, la mevalonato cinasa tanto de cerebro como de riñón resultan fuertemente inhibidas por los agentes que bloquean los grupos -SH. Particularmente claro es el efecto del p-hidroximercuribenzoato que a una concentración 0.01 mM inhibe ya a la enzima de cerebro, mientras que la de riñón requiere concentraciones más elevadas (0.1 mM) para ser inhibida. El mismo efecto inhibitor presentaba el p-hidroximercuribenzoato sobre la enzima de hígado de pollo, de donde parece deducirse que en cualquiera de los órganos estudiados, la enzima tiene en su centro activo algún grupo-SH que es particularmente accesible a la acción del p-HMB. Otros agentes de este tipo prácticamente no le afectan, como es el caso de la N-etilmeleimida, mientras que otros como el DTNB solo ejerce inhibición a elevadas concentraciones (10.0 mM). Este comportamiento de la mevalonato cinasa de pollo no es esencialmente particular, por cuanto que la misma enzima presenta, según el origen de que proceda, un inhibidor más fuerte que otro.

Las variaciones exhibidas por la actuación de la mevalonato cinasa a lo largo del desarrollo postnatal son sumamente interesantes. En efecto, como veíamos al principio de esta Memoria, el pollo es un animal que nace prácticamente mielinizado por lo que la biosíntesis del colesterol en el cerebro debe ocurrir durante el periodo embrionario. Aún este constituyente de la mielina debe ser formado del saco vitelino. El hecho de que la actividad mevalonato cinasa de cerebro sea francamente elevada en el momento de la eclosión y vaya disminuyendo progresivamente a medida que el pollo va aumentando la edad parece sugerir que, al menos durante la última etapa del periodo embrionario, existe también una fuerte actividad enzimática, necesaria para la biosíntesis del colesterol en éste órgano, actividad que va decayendo a medida que el colesterol es menos necesario para el cerebro ya mielinizado (figura nº 27).

Algo semejante podría ocurrir con el riñón, en el cual la fosforilación del ácido mevalónico podría conducir bien a la síntesis de colesterol, o bien a la formación de cuerpos cetónicos, vía "shunt" del mevalonato, los cuales podrían ser utilizados posteriormente por el cerebro para la propia mielinización.

En este sentido es de destacar el comportamiento diferente exhibido por la mevalonato cinasa de hígado de pollo, la cual presenta un aumento significativo de su actividad entre los días 6-7 después de la eclosión (93), incremento que podría corresponder con la época en que aumenta la síntesis "de novo" del colesterol en este órgano.

Figura nº 27



Cantidad de P-MVA formado a lo largo del desarrollo postnatal de pollo por extractos libres de células de cerebro (●) y riñón de pollo (○). Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

Un incremento paralelo parece sufrir la cantidad de colesterol libre ya que la proporción colesterol esterificado / colesterol libre disminuye con el tiempo, llegando a ser la cifra de colesterol libre algo superior a la del esterificado en pollo de diez días (161). Estos resultados coinciden con los de Deuel (162) quien afirma que en el pollo adulto la proporción de colesterol esterificado en el hígado es solo de un 7% del total. Todo ello hace suponer que el ester del colesterol cumple una función única en el embrión, bajando la proporción de ester cuando el pollo desarrolla sus propios mecanismos para la síntesis del colesterol. Queda aun por estudiar de una manera concreta las variaciones de las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa a lo largo del desarrollo embrionario, pero los resultados presentados en esta Memoria permiten sugerir que la mevalonato cinasa tiene un comportamiento paralelo al que sufre la síntesis del colesterol en los diferentes órganos de pollo a lo largo de su desarrollo postnatal. Este comportamiento característico, mucho más acusado que el de la fosfomevalonato cinasa hace pensar en una importancia fundamental de la primera de las enzimas de fosforilación del MVA en el metabolismo de este ácido "in vivo".

La última parte de esta Memoria contempla alguno de los posibles factores fisiológicos que pueden afectar a la fosforilación del MVA como son la influencia del colesterol suministrado con la dieta, la influencia del ayuno y la de un ritmo ciclico luz-oscuridad. Todos estos factores afectan a la biosíntesis del colesterol en la primera de sus grandes etapas, es decir entre el acetil-CoA y el MVA, estando descrito su efecto sobre la HMG-CoA reductasa, especialmente de hígado de rata (5). Re-

cientemente parece haberse establecido una cierta regulación por algunos de estos factores a nivel de la transformación MVA → Ip-PP en hígado de rata (16) por lo que nos pareció de interés estudiarlo en aves. Concretamente hemos utilizado pollos recién nacidos o de muy corta edad, que no podían estar acostumbrados a ninguno de los tratamientos necesarios o que a lo sumo lo estuvieron durante algunos días, por lo que los resultados obtenidos no pueden ser tomados como definitivos. En efecto, la alimentación con colesterol al 5% suplementado a la dieta desde el momento de la eclosión hasta los 10 días no parece influir sobre la fosforilación del MVA ni el cerebro ni el riñón. Sin embargo sería necesario un mayor periodo de tratamiento ó el utilizar pollos adultos para intentar establecer conclusiones definitivas en este aspecto. No obstante, también sería necesario llevar a cabo en hígado un estudio semejante al realizado en los otros dos órganos, con objeto de comparar los resultados y establecer en el hígado la existencia ó no de variaciones significativas.

Lo mismo podría decirse sobre las experiencias de ayuno y sobre la influencia del ritmo cíclico luz-oscuridad. En estos casos la necesidad de mayor tratamiento ó de mayor edad es aún más perentoria, ya que los pollos pequeños no son capaces de sobrevivir tras largos periodos de ayuno ni, por otra parte, han podido ser acostumbrados a un ritmo perfecto de luz-oscuridad. Las variaciones observadas en estas experiencias entran dentro de los límites normales de error por lo que no permiten establecer conclusiones definitivas.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This not only helps in tracking expenses but also ensures compliance with tax regulations. The text further explains that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors in the accounting process. It also mentions that proper record-keeping is crucial for financial planning and decision-making. The document concludes by stating that these practices are fundamental for the long-term success and stability of any business.

In addition, the document highlights the role of technology in modern accounting. It suggests that using accounting software can significantly reduce the risk of human error and streamline the reporting process. It also notes that staying updated with the latest accounting standards and regulations is a continuous process. The text provides a brief overview of the different types of accounting, including financial, management, and tax accounting, and their respective applications. It ends with a call to action, encouraging businesses to adopt best practices and seek professional advice when needed.

V. - CONCLUSIONES

V. - CONCLUSIONES

1º. - Se han demostrado las reacciones de fosforilación del ácido mevalónico por preparaciones de cerebro y riñón de pollo recién nacido, estableciéndose las condiciones óptimas para su desarrollo "in vitro" como son la proporcionalidad: productos formados / proteína enzimática y productos formados / tiempo de incubación

2º. - Tanto la mevalonato cinasa de cerebro como la de riñón de pollo recién nacido aumentan su actividad a medida que lo hace el pH, dentro de los límites ensayados (5.5.-9.5), alcanzándose la máxima cantidad de P-MVA a pH 9.5. Un comportamiento semejante aunque menos acusado exhibe la fosfomevalonato cinasa.

3º. - Los dos enzimas que intervienen en la fosforilación del ácido mevalónico tienen una localización citoplasmática, aislandose preferentemente de la fracción sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$.

4º. - La fosfomevalonato cinasa resulta inhibida por 5 minutos de tratamiento a $50^{\circ} C$ ó a $65^{\circ} C$. La mevalonato cinasa pierde su actividad por calentamiento a $65^{\circ} C$ durante 5 minutos, pero la incrementa ligeramente cuando es mantenida de 5-10 min a $50^{\circ} C$ resultando parcialmente inactivada con posterioridad.

5º. - Ambas enzimas fosforilantes del MVA presentan un requerimiento absoluto de nucleótidos, siendo el ATP el más activo, seguido por el ITP, en los dos órganos estudiados. El UTP y el GTP son prácticamente inactivos.

6º. - Los iones Mn^{2+} son más activos que los iones Mg^{2+} cuando se adiciona a pequeñas concentraciones (0.1 -1.0 mM). A concentración más elevada (5.0 -10.0 mM) el Mn^{2+} ejerce una clara inactivación de la mevalonato cinasa, mientras que el Mg^{2+} incrementa la actividad enzimática a medida que aumenta su concentración. La inhibición por Mn^{2+} es mucho más clara en el cerebro que en el riñón. Los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} son prácticamente inactivos, mientras que los iones Hg^{2+} inhiben completamente a la mevalonato cinasa.

7º. - La mevalonato cinasa y la fosfomevalonato cinasa de cerebro y de riñón de pollo recién nacido no requieren la suplementación de protectores de grupos -SH. El DTT y el glutatión inhibe ligeramente a la mevalonato cinasa a concentración 0.1 -10.0 mM, mientras que el β -mercaptoetanol prácticamente no lo afecta.

8º. - La mevalonato cinasa es completamente inhibida por el p-hidroximercuribenzoato a partir de una concentración 0.01 mM, mientras que el DTNB solo inhibe completamente a concentración 10.0 mM. La N- etilmaleimida no tiene prácticamente ningun efecto.

9º. - La mevalonato cinasa presenta su máxima actividad en el cerebro en el momento de la eclosión, disminuyendo posteriormente a medida que aumenta la edad del pollo hasta el día 6 a partir del cual tiende a estabilizarse. Una variación semejante presenta la enzima del riñón.

10º. - La fosfomevalonato cinasa presenta solo muy ligeras variaciones en su actividad a lo largo de los primeros tres días de desarrollo, tendiendo a disminuir posteriormente.

11º. - La suplementación de colesterol al 5% a la dieta no parece influir sobre la actividad de la enzimas fosforilantes del ácido mevalónico en cerebro ni en riñón.

12º. - El ayuno de 24-48 h no afecta a las actividades enzimáticas en estudio.

13º. - El mantenimiento de los animales durante periodos alternos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad no parece afectar a los enzimas fosforilantes del MVA.

Conclusión general

La actividad específica de la mevalonato cinasa es superior en cerebro que en riñón de pollo y presenta variaciones

semejantes a lo largo del desarrollo postnatal, disminuyendo progresivamente desde el momento de la eclosión hasta el día 6, a partir del cual su actividad se mantiene dentro de unos límites semejantes.

Se han establecido las condiciones óptimas para el estudio de la fosforilación del MVA "in vitro", estudiando las propiedades de las enzimas implicadas: pH óptimo, requerimientos nucleotídicos y metálicos, influencia de protectores e inhibidores de grupos -SH, etc.

VI. - BIBLIOGRAFIA

VI. - BIBLIOGRAFIA

1. - BEYTIA, E. D. y PORTER, J. W. 1976. An. Rev. Biochem. 45, 113-142.
2. - WAGNER, A. F., FOLKERS, K. 1961. Adv. Enzymol. 23, 471-83.
3. - TAVORMINA, P. A., GIBBS, M. H. and HUFF, J. W. 1956, Utilization of β -hydroxy- β -methyl-valerolactone in cholesterol biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. 78, 4498-99
4. - DECKER, K. and BARTH, Ch. 1973. Compartmentation of the early steps of cholesterol biosynthesis in Mammalian liver Mol. and Cell. Biochem. 2, 2, 179-88
5. - RODWELL, V. W., NORDSTROM, J. L., and MITSCHELEN, J. J. Regulation of HMG-CoA Reductase. Adv. Lipid. Res. 14, 1-74. (1976).
6. - RAMACHANDRAN, C. K. and SHAH S. N. 1977. Studies on Mevalonate kinase, Phosphomevalonate kinase and Pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain J. Neurochem. 28, 751-57
7. - JOHNSON, R. C. and SHAH, S. N. 1974. Microsomal Synthesis of Cholesterol from Squalene, Lanosterol and Desmosterol. An. Biochem. and Biophys. 164, 502-10
8. - KANDUTSCH, A. A. and SAUCIER, S. E. 1969. Prevention of Cyclic and triton induced increases and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. J. Biol. Chem. 244, 2299-2305.

9. - PACKIE, R.M. and KANDUTSCH, A.A. 1973. Rates of sterol synthesis and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase levels and the effect of cholest-4-en-3 one on these parameters in the livers of inbred-strains of mice. *Biochem. Genet.* 4, 203-214.
10. - GANS, J.H., BLOCK, A. J. and CARTER, M. R. 1973. "In vivo" incorporation of ^{14}C into liver and kidney sterol from parenterally administered (2- ^{14}C) D. L-mevalonic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 609-612.
11. - SLAKEY, L.L., NESS, G.C., QURESHI, N. and PORTER, J. W. 1973. Occurrence of the enzymes affecting the conversion of acetyl CoA to squalene in homogenates of hog aorta. *J. Lipid Res.* 14, 485-494.
12. - BELL, F.P. 1976. Biosynthesis of various sterol. Sterols esters and squalene from (^{14}C) mevalonate by normal swine intima and media "in vitro". A comparative study *Exp. Mol. Pathol.* 25, 279-292.
13. - EDGREN, B and HELLSTROM, K. 1972. Lipid biosynthesis from DL (2- ^{14}C) mevalonic acid in intact mice and rabbits. *Acta Physiol. Scand.* 86, 250-256.
14. - BACK P., HAMPRECHT B., and LYNEN F. 1969. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21.
15. - HICKMAN P. E., NORTON B. J. and SABINE J. R. 1972. Effect of adrenalectomy on the diurnal variation of hepatic cholesterolgenesis in the rat. *J. Lipid Res.* 13, 17-22.

16. - BHAT, C. S. and RAMASARMA, T. 1977. Rhythmic activity of utilization of mevalonate for biogenesis of cholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-88
17. - SHAH, S. N. 1973. Regulation of hepatic cholesterol synthesis from mevalonate in suckling and weaned rats. *Lipids.* 8, 284-288
18. - JOHNSON , R. C. and SHAH, S. N. 1977. Hepatic cholesterol synthesis from mevalonate and squalene in rats: Effect of feeding cholesterol supplemented diet during weaning and following starvation . *Lipids.* 9, 962-970
19. - GOULD, R. G. and SWRYD, E. A. 1966. Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *J. Lipid. Res.* 7, 698-707
20. - SHAPIRO, D. J. and RODWELL, V. W. 1971. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis, *J. Biol. Chem.* 246, 3210-3216.
21. - SLAKEY, L. L., CRAIG, M. C., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., FELDBRUEGGE, D. H., DUGAN, R. E., QURESHI, A. A. ., SUBBARAYAN, C. y PORTER, J. W. 1972. The effects of fasting, refeeding and time of day on the levels of enzymes effecting the conversión of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A to squalene. *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022.
22. - RAO, G. S. and RAMASARMA, T. 1972. ATP in the regulation of cholesterol biosynthesis. A supra-energetic role. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 225-229.
23. - RAICHT, R. F., COHEN, I. B., SHEEFER, S. and MOSBACH, E. H. 1975. Sterol balances studies on the rat. Effects of dietary cholesterol and B-sitosterol balance and rat-limiting enzymes of sterol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 388. 374-384.

24. - WISS, O. 1976 . Influence of a lipogenic diet on the cholesterol synthesis in rats "in vivo" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 350-352.
25. - WISS, O. 1976. Influence of fasting and cholesterol feeding on the cholesterol synthesis in rats "in vivo". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 353-357.
26. - RODRIGUES, M. P. y LEAL, R. S. 1970. Hepatic mevalonate metabolism in the presence of fluoride ion *C.R. Soc. Biol.* 164, 2701.
27. - HORNBY, G.M. ONAJOBI, F.D. and BOYD, G. S. 1970. The effects of thiols on cholesterol synthesis by rat liver "in vitro" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 524-529.
28. - KURODA, M. and ENDO, A. 1977. Inhibition of "In vitro" cholesterol synthesis by fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 468, 70-81.
29. - MITROPOULUS, K. A., GIBBONS, G. F., CONNELL, C.M. and WOODS, R.A. 1976. Effects of triarimol on cholesterol biosynthesis in rat-liver subcellular fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 892-900.
30. - DURR, I. F. 1968, Factors affecting the metabolism of mevalonate by adipose tissue comp. *Biochem. Physiol.* 25, 663-671.
31. - DURR, I. F. and MURAD, M. 1971. Comparative metabolism of mevalonate in intestinal-mucosa of rat, cat and dog. *Int. J. Biochem.* 2, 249-252.
32. - RITTEMBERG, D., SCHOENHEIMER, R. 1937. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism . XI Further Studies on the biological uptake of deuterium into organic substances , with special reference to fat and cholesterol formation. *J. Biol. Chem.* 121, 235-253. ,

33. -BLOCH, K., BERG, B.N. RITTEMBERG, D., 1943. - The biological conversion of cholesterol to cholic acid J. Biol. Chem. 149, 511-517
34. - CHEVALIER F. 1956. Origine des stérols fécaux .II .Détermination des quantités des stérols excrétés et secretés et de la fraction du cholestérol des parois digestives renouvelés par transfert. Bull. Soc. Chim. Biol. 42. 633-641.
35. - BLOCH, K.; BOREK, E., RITTENBERG, D, 1946. - Synthesis of cholesterol in surviving liver. J. Biol. Chem. 162, 441-449
36. - SZERE, P.A., CHAIKOFF, I. L. TREITMAN, S.S. BURSTEIN, L. S. 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol . J. Biol. Chem. 182, 629-634.
37. - GOULD, R. G. , COOK, R.P. 1958, The metabolism of cholesterol and other sterols in the animal organism. In "Cholesterol" ed. Cook. R.P. , Academ. Press New York, 237-307
38. - KRITCHEVSKY, D (ed.) 1958. Cholesterol, John Wiley Sons, New York.
39. - GOULD, R. G. , TAYLOR, C.B. 1950. - Effect of dietary cholesterol on hepatic cholesterol synthesis. Fed. Proc. 9, 179.
40. - SIPERSTEIN, M.D. FAGAN, V.M. 1964. - In: Advances in Enzyme regulation Vol II. edited by Werber G. Pergamon Pres, Oxford, 249-264.
41. - BELL, G.H. DAVIDSON, J.N. SCARBOROUGH, H. (Edit.) 1963. - Physiology and biochemistry and S. Livingstone, Edinburgh and London

42. - GANONG, W.F. (editor) 1965. Medical Physiology, Blackwell scientific Publications, Oxford.
43. - CHEVALLIER, F., 1956 L'espace cholesterol du rat. Arch. Sci. Physiol. 10, 249-275.
44. - CHEVALLIER, F., 1956. - Synthèse du cholestérol chez le rat. Résultats obtenus a l'aide de L'acetate-1-¹⁴C. Arch. Sci. Physiol. 10. 321-336.
45. - CHEVALLIER, 1967. Dynamics of cholesterol in rats, studied by the isotopic equilibrium method. Advances in Lipid Research Vol V. edited by R. Paoletti, D. Kritchevsky, Academic Press, New York, 209-230.
46. - HAGER MANN, J. S. GOULD, R.G. 1951. The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red cells Proc. Soc. Exp Biol (N. Y.) 78, 329-332.
47. - D'HOLLANDER F, CHEVALLIER F. 1972. - Movement of cholesterol in vitro in rat blood and quantitation of the exchange of free cholesterol between plasma and erythrocytes J. Lipid. Res. 13, 733 -744.
48. - CHEVALLIER, F., LUTTON, C. 1966. - Vitesses des processus de renouvellement du cholesterol contenu dans son espace de transfert chez le rat. I. Methodes et resultats obtenus dans le cas d'un régime semisynthétique témoin. Bull. Soc. Chim. Biol (Paris, 48, 507-523.
49. - LUTTON C. CHEVALLIER F. 1972. - Vitesses des procesus de renouvellement du cholesterol contenu dans son espace de transfert chez la rat. III. Modifications et étude critique de la méthode d'équilibre isotopique. Biochem. Biophys. Acta (Amst) 255, 762-777.
50. - CHEVALLIER F. and MATHE D. Cholesterol biosynthesis interest of comparing "in vivo" and "in vitro" findings. Path. Biol. 24, 6, 377-381.

50. - CHEVALLIER F. and MATHE D. Cholesterol biosynthesis interest of comparing "in vivo" and "in vitro" findings. *Path.Biol.* 24, 6, 377-381.
51. - CHEVALLIER, F. Lutton C. 1973, - The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol.* 242, 61-62.
52. - LUTTON C. , CHEVALLIER F. 1976. - Coefficient d'absorption du cholesterol alimentaire paramètre fondamental de l'équilibre dynamique du cholesterol chez le rat *Biomédecine*
53. - CHEVALLIER F. MAGOT T. 1975. - Evidence of major role of the intestine in cholesterol synthesis in the adult mole rat. *Experientia. (Basel)* 31. 627-629.
54. - GIBSON, W. R. and NALBANDOV, A. V. 1966 Lipolysis and lipogenesis in liver and adipose tissue of hypophysectomised cockerels. *Am. J. Physiol.* 211 1352-1356.
55. - LEVEILLE, G.A. , O'HEA E.K. and CHAKRABARTY. 1968 In vivo Lipogenesis in the domestic fowl. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 398-401.
56. - LEVEILLE, G.A. 1966 Glycogen metabolism in mealfed rats and chicks and the time sequence of lipogenic and enzymatic adaptative changes. *J. Nutr.* 90. 449-460.
57. - GOODRIDGE, A. G. 1968 a. Conversion of (U-¹⁴C) glucose into carbon dioxide. glycogen cholesterol and fatty acids in liver slices from embryonic and growing chicks. *Biochem. J.* 108, 655-661.

58. - O'HEA, E.R. and LEVEILLE, G.A. 1969 b Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick. (*Gallus domesticus*)
Comp. Biochem. Physiol. 30. 149-159.
59. - GOODRIDGE, A.G. and BALL E. G. 1966 Lipogenesis in the pigeon in vitro studies Am. J. Physiol. 211., 803-808.
60. - GOODRIDGE A. and BALL E.G. 1967 Lipogenesis in the pigeon in vivo Studies. Am. J. Physiol. 213, 245-249.
61. - EVANS, A. J. 1972. In vitro lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbuzy duck at different ages
Br. Pult Sci. 13, 595-602.
62. - SCHOENHEIMER R. RITTEMBERG D, 1930 Deuterium as an indicator in the Study of intermediary metabolism. VII Synthesis and destruction of fatty acids in the organism J. Biol. Chem. 114. 381-396.
63. - KILSHEIMER, G. S. WEBER, D. R. and ASHMORE J. 1960 Hepatic glucose production in developing chicken embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 515-518.
64. - FAVARGER, P. 1965. In: Hand-book of Physiology Section 5-: Adipose tissue, edited by A.E. RENOLD and G.F. CAHILL, Jr. Washington, D. C. Am. Physiol. Soc. 19
65. - LEVEILLE, G.A. 1967 b. In vivo fatty acid and cholesterol synthesis in fasted and fasted-refed chicks. J. Nutr. 98, 367-372.
66. - GALTON, D. J. 1968 Lipogenesis in human adipose tissue. J. Lipid Res. 9, 19-26.

67. -SHRAGO, E. SOLENON, J. A. and GORDON, E. S. 1971 Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism* 20. 54-62.
68. - SHRAGO, E. SPENNETTA T. and GORDON E. 1969 Fatty acid synthesis in humane adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 244 2761-2766.
69. - LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
70. - LEVEILLE; G. A., ROMSOS, D.R., YEH, Y.Y. and O'HEA, E. K. 1975 Lipid biosynthesis in the chick . A consideration of site of synthesis. Influence of diet and Possible Regulatory mechanisms. *Poultry Sc.* 54. 1075-1093.
71. - TEEKEL, R. A., BREIDENSTEIN, C. P. and WATTS, A. B. 1975 Cholesterol metabolism in the chicken. *Poultry Sci.* 54 1036-1042 .
72. - SHABALINA, A. 1975. Genetic studies on cholesterol in the chicken *C. R. Acad. Agric. G. Dimitov.* 8, 109-113.
73. - HO, K .J. 1976. Cholesterol contents of various tissues of chickens with exogenous or endogenous hypercholesterolemia. *Amer. J. Clin. Nutrition* 29, 187-191.
74. - CHVAPIL, M., STITH, P. L. TILLEMA, L. M. CARLSON, E.C., CAMPBELL, J. B. and ESKELSON, C. D. 1976. Early changes in the arterial wall of chickens fed a cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 24, 393-405.

75. - WORCESTER, N. A. , BRUCKDORFER, K. R. and YUDKIN, J. 1975
Effect of dietary sucrose and dietary cholesterol on hyperlipidaemia and atherosclerosis in white Leghorn cockerels (Gallus domesticus) Proc. Nutr. Soc. 34, 81A.
76. - WORCESTER, N. A. BRUCKDORFER, K. R. and YUDKIN, J. 1975
The effect of dietary sucrose and different dietary fats on hyperlipidaemia and atherosclerosis in White Leghorn cokerels (Gallus domesticus) Proc. Nutr. Soc. 34. 82A.
77. - SKLAN, D. , BUDOWSKI, P. and HURWITZ, S. 1974. Effect of soy sterols on intestinal absorption and secretion of cholesterol and bile acids in the chick. J. Nutr. 104, 1086-1090.
78. - GODFREY, J. C. , LUTTINGER; J. R. TAYLOR, H. D. and SANHYEZA G. M. 1976: Dietary plant sterol-induced reduction of egg yolk cholesterol in the chicken. Nutr. Rep. Int. 13, 263-271.
79. - HWANG, E.C. , GRIMMINGER, P. and FISHER, H. 1975. Effect of anti-hypercholesterolemic substances (AHS) on liver vitamin A activity in normo- and hypercholesterolemic chickens. Nutr. Rep. Int. 11. 185-191.
80. - HWANG, E.C. , GRIMINGER, P. and FISHER, H. 1975. Effect of varying levels of cholestyramine and Sephadex on liver vitamin A concentration of chickens fed three levels of cholesterol. Nutr. Rep. Int. 11, 193-198.
81. - WOODS, J. E. and PODCZASKI, E. S. 1974. Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol 24, 413-423.

82. - KALLIECHARAN, R. and HALL, B. K. 1974 A developmental study of the levels of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone circulating in plasma of chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 24. 364-372
83. - KALLIECHARA, N. R. and HALL, B.K. 1976. A developmental study of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone in the adrenal glands of the embryonic chick. Gen. Comp. Endocrinol. 30. 404-409
84. - IDLER, D. R., WALSH, M. J. KALLECHARAN, R. and HALL, B. K. 1976 Identification of cortisol in plasma of the embryonic chick. Gen. Comp. Endocrinol. 30. 539-540
85. - BOUCEK, R. J. and SAVARD, K. 1970. Steroid formation by the avian ovary "in vitro", Gen. Comp. Endocrinol. 15. 6-11
86. - GALLI, F.E., IRUSTA, O. and WASSERMAN, G. F. 1975. Metabolism of steroids by left ovaries of Gallus domesticus during post embryonic maturation. Acta Phys. Lat. Amer. 25, 60-66
87. - NAKAMURA, T., TANABE, y and KATUKAWA, I. 1974. Steroidogenesis "in vitro" by the ovarian tissue of the domestic fowl. J. Endocrinol. 63. 507-516
88. - CLINKENBEARD, K. D. REED, W. D., MOONEY, R. A. and LANE, M. D. 1975. Intracellular localization of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A generating system for cholesterologenesis and ketogenesis. J. Biol. Chem. 250, 3108-3116

89. - CLINKENBEARD, K. D., SUGIYAMA, T., REED, W. D. and LANE M. D. 1975. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from liver. Purification, properties and role in cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 250, 3124-3135.
90. - REED, W. D., CLINKENBEARD, K. D. and LANE, M. D. 1975. Molecular and catalytic properties of mitochondrial (Ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver *J. Biol. Chem.* 250, 3117-3123.
91. - BEG, Z.H., STONIK, J. A. and BREWER, Jr. H. B. 1977. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from chicken liver *FEBS Lett* 80, 123-129
92. - KING, Jr., H. L. and RILLING, H. C. 1977. Avian liver phenyltransferase. The role of metal in substrate binding and the orientation of substrates during catalysis. *Biochem.* 16, 3815-3819.
93. - GARCIA-MARTINEZ J., SEGOVIA J.L., SUAREZ M.D., and GARCIA PEREGRIN E. 1976. Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 72, 1, 202-208.
94. - HELLSTROM K., SIPERSTEIN M., BRICKER L. y LUBY L. 1973. "In vivo" metabolism of mevalonic acid in the normal rat. *J. Clin. Invest.* 52, 1303-1313.
95. - RASKIN PH. and SIPERSTEIN m. D. 1974. Mevalonate metabolism by renal tissue in vitro. *J. Lipid Res.* 15. 20-25.

96. - EDMOND, J. and POPJAK, G. 1974. Transfer of carbon Atoms from Mevalonate to n-fatty Acids J. Biolog. Chem. 249, 1, 66-71
97. - FOGELMAN, A. M., EDMOND, J. and POPJAK, G. 1975. Metabolism of mevalonate in rats and man not leading to sterols. J. Biol. Chem. 250, 1771-1775
98. - RIGHETTI, M., WILLEY, M. H. MURRILL, P. A. and SIPERSTEIN, M. D. 1976. The "in vivo" metabolism of mevalonate by sterol and non sterol pathways. J. Biol. Chem. 251, 2716-2721
99. - EDMOND, J., FOGELMAN, A. M. y POPJAK, G. 1976. Mevalonate metabolism: Role of kidneys. Science 193, 154-156
100. - JOHNSON, B. L., EDMOND, J. FOGELMAN, A. M. and POPJAK, G. 1976, Mevalonate metabolism: Effect of $K_2Cr_2O_7$ a renal tubular toxin Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1264-1269
101. - WILEY M. H., HOWTON M. M., SIPERSTEIN M. D. 1977. The quantitative role of the kidneys in the "in vivo" metabolism of mevalonate. J. Biol. Chem. 252, 548-554.
102. - CUZNER, M. L. DAVISON, A. N. GREGSON, N. A. 1965. Chemical and Metabolic studies of rat myelin in the central nervous system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 122, 86-89
103. - O'BRIEN J. S. 1967 Cell Membranes composition structure function . J. theoret. Biol. 15, 307-311

104. - CHEVALIER, F. and GAUTHERSON, C. 1969. A methods for the study of cholesterol biosynthesis in the central nervous system. Incorporation of 2-¹⁴C mevalonic lactone after intraperitoneal, intracisternal and intraventricular administration in the rat J. Neurochem. 16. 323-331
105. - RAMSEY, R. B., JONES, J. P. NAQVI, S. H. M. and NICHOLAS H. J. 1971 The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue. I. Subcellular biosynthesis "in vitro" Lipids. 6, 154-161
106. - RAMSEY, R. B., JONES, J. P., NAQVI, S. H. M. and NICHOLAS H. J. 1971 Biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue : II. Comparison of "in vitro" and "in vivo" methods. Lipids. 6, 225-232
107. - EDMOND, J. 1974, Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. J. Biol. Chem. 249, 72-80
108. - TCHEN T. T. 1958. Mevalonic kinase: purification and properties. J. Biol. Chem. 233, 1100-1103.
109. - LEVY, H. R. y POPJAK, G. 1959. Mevalonic liver kinase. Biochem. J. 72, 35 P
110. - COOPER, C. Z. and BENEDICT; C. R. 1967, Mevalonic acid kinase in Euglena gracilis. Plant. Physiol. 42, 515-519
111. - CORNFORTH, R. H., CORNFORTH, J. W. and POPJAK, G. 1962. Preparation of (R)-and (S) mevalonalactones. Tetrahedron 18, 1351-1354

112. - CORNFORTH, R. H. , FLETCHER, K. , HELLIG, H. and POPJAK G. 1960. Sterospecificity of enzymic reactions involving mevalonic acid . Nature 185, 923-924.
113. - MARKLEY K. and SMALLMAN, E. 1961 Mevalonic kinase in rabbit liver Biochim. Biophys. Acta. 47, 327-335
114. - LEVY, H. R. and POPJAK, G. 1960. Biosynthesis of cholesterol. X. Mevalonic kinasa and phosphomevalonic kinase from liver. Biochem. J. 75, 417-428.
115. - DORSEY, J. K. and PORTER, J. W. 1968. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. J. Biol. Chem. 243, 4667-4670
116. - BENEDICT, C. R. , KETT, J. and PORTER, J. W. 1965. Properties of farnesyl pyrophosphate synthetase of pig liver Arch. Biochem. Biophys. 110, 611-621
117. - HOLLOWAY, P. W. and POPJAK, G. 1967. The purification of 3-3-Dimethyl-ally-a and geranyl transferase and og isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver, Biochem. J. 104, 57-25 p
118. - FLINT, A. P. F. 1970. The activity and kinetic properties of mevalonate kinase in superovulated rat ovary. Biochem. J. 120, 145-150
119. - BEYTIA E. , DORSEY J. K. , CLELAND W. W. , and PORTER J. W. 1970. Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase. J. Biol. Chem. 245. 5450-5458.
120. - GOODFELLOW, R. D. and BARNES, F. J. 1971, Mevalonate kinase from the larva of the fleshfly, Sarcophaga bullata Insect. Biochem. 1, 271- 282

121. - BARNES, F. J. and GOODFELLOW, R. D. 1971. Mevalonate kinase localization and variation in activity during development of Sarcophaga bullata. J. Insect Physiol. 17, 1415-1427
122. - GOODFELLOW; R. D., BARNES; F. J. and GRAHAM= W. J. 1971. Dietary sterol effects of mevalonate kinase activity in axenic and non -axenic Sarpophaga bullata. J. Insect Physiol. 17, 1625-1635
123. - OHNOKI, S., SUXUE, G. and TANAKA, S. 1962. 5-Phosphomevalonic acid as the intermediate of the enzymatic synthesis of bacterial phytoene. J. Biochem. 52, 423-427
124. - GREEN T. R. and BAISTED, D. J. 1970. A mevalonate kinasa assay. Anl. Biochem. 38, 130-138
125. - PORTER J. W. and GUCHHEIT R. B. 1966. A gas liquid chromatographic method of assay for mevalonic acid. Anal. Biochem. 15, 509-516.
126. - BLOCH, K., RASSON, E. y PORTER, J. W. 1968 Separation of water soluble steroid and carotenoid precursors by DEAE-Cellulose colum, chromatography . Anal. Biochem. 22, 249-259
127. - DUGAN, R. E. CHAYKIN, S., PHILIPS, A. H. y de WAARD, A. 1959 Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. J. Biol. Chem. 234, 2595-2604
128. - TCHEN, T:T. 1962. Methods in Enzymology. Colowicks S. P, and Kaplan, N. O. Vol. 5, 489-499. Academic Press, New York
129. - GREEN, T. R. y BAISTED, D. J. 1972, Development of the activities of the enzymes of the isoprenoid pathway during early stages of pea-seeds germination. Biochem. J. 130, 995

130. - WILLIAMSON, I. P. y KERWICK, R. G. O. 1965. The formation of 5-phosphomevalonate by mevalonate kinase in Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 96, 862-871
131. - CHESTERTON, C. J. y KERWICK, R. G. O. 1966. Formation of ³-isopentenyl phosphate by Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 98, 26 P.
132. - VELENZUELA, P., BEYTIA, E. CORI, O. Y YUDELEVICH, A. 1966. Phosphorylated intermediates of terpene biosynthesis in Pinus radiata. *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 536-539
133. - VALENZUELA, P., CORI, O and YUDELEVICH, A. 1966. Occurrence of monoterpenes in Pinus radiata and utilization of labeled CO₂ and mevalonic acid. *Phytochem.* 5, 1005-1011
134. - BEYTIA, E., VALENZUELA, P. y CORI, O. 1969. Terpene biosynthesis: formation of nerol, geraniol and other prenyls by an enzyme system from Pinus radiata seedling. *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 346-359
135. - GARCIA-PEREGRIN, E. 1970. Incorporación de ácido mevalónico (MVA-1-¹⁴C y MVA-2-¹⁴C) por plantas Pinus pinaster. *Ars. Pharm.* XI 15-33
136. - GARCIA PEREGRIN, E. y MAYOR, F. 1969. Influence of some-SH group effectors on the incorporation of mevalonic acid by Pinus pinaster seedlings. *Rev. Esp. Fisiol.* 26, 209-216
137. - SUAREZ, M. D. GARCIA PEREGRIN, E. y MAYOR F. 1974. Mevalonate kinase from Pinus pinaster seedlings. *Phytochem.* 13, 1059-1063

138. - GARCIA PEREGRIN, E. SUAREZ, M. D. y MAYOR F. 1973. Isolation of two fractions with mevalonate kinase activity from Pinus pinaster and Agave americana. FEBS Letters 30, 15-17
139. - GARCIA PEREGRIN, E. SUAREZ, M. D. ARAGON, M. C y MAYOR F. 1972. Mevalonate phosphorylation in Agave americana. Phytochem. 11, 2495-2498
140. - SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN, E. 1977 Properties and partial purification of mevalonate kinase from Agave americana Phytochem. 16, 661-665
141. - OSHIMA-OBA K and URITANI I. 1969. Phytopathological chemistry of sweet potato with black rot and injury LXXVIII. Enzymatic synthesis of isopentenyl pyrophosphate in sweet potato root tissue in response to infection by black rot fungus. Plant. Cell. Physiol. 10, 827-843.
142. - POTT, V. H. y BRUEMMER, J. H. 1970. Mevalonate-activating enzymes in the orange. Phytochem. 9, 99-105
143. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1972. The inhibition of plant mevalonate kinase preparations by prenyl pyrophosphates. Biochim. Biophys. Acta. 279, 290-296
144. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1969. Mevalonate kinase from etiolated cotyledon of French beans. Biochem. J. 113, 37 P
145. - GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O. 1973. An assessment of some molecular parameters of mevalonate kinase from plant and animal sources. Arch. Biochem. Biophys. 150, 458-462

146. - THOMAS, D. R. y STOBART, A.K. 1970. Mevalonate activating enzyme in greening tissue cultures. *Phytochem.* 9, 1443-1451
147. - HILL, H. W. y ROGERS, L. J. 1974. Mevalonate activating enzymes and phosphates in higher plants. *Phytochem.* 13, 763-777
148. - DOWNING M.R. and MITCHELL E.D. 1974. Metabolism of mevalonic acid to phosphorylated intermediates in a cell-free extract from Nepeta cataria . *Phytochem.* 14, 369-371.
149. - DOWNING, M. R. y MITCHELL, E. D. 1975. Mevalonate activating enzymes in callus culture cells from Nepeta cataria. *Phytochem.* 14, 369-371
150. - LINARES, A. SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN, E. 1977, Metabolism of mevalonic acid to phosphorylated derivatives in chlorella. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 974-980
151. - HENNING, V., MOSLEIN, L. M. y LYNEN F. 1959. Biosynthesis of terpenes V. Formation of 5-pyrophosphomevalonic acid by phosphomevalonic kinase. *Arch. Biochem.* 83, 259-267.
152. - NORDIIE, R. y LARDY, H. 1962. - The enzymes Boyer, P. D. Lardy, H. y Myrback, K. Vol. 6, 3-46. Academic Press. London
153. - HELLING, H. y POPJAK, G. 1961. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XIII. Phosphomevalonic kinase from liver *J. Lipid. Res.* 2, 235-243.
154. - SKILLETER, D. N., WILLIAMSON, I. P. y KEKWICK, P. G. O. 1966. Phosphomevalonate kinase from Hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.* 98, 27 P.

155. - SKILLETER D.N. y KEKWICK R.G.O. 1971. Enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate-5-phosphate) in the latex of Hevea brasiliensis. *Biochem. J.* 124, 407-417.
156. - RUZICKA L. 1953. The isoprene rule and the biogénesis of terpenic compounds. *Experientia.* 9, 357-367.
157. - ARAGON M.C. 1971. Estudio radiocromático de la incorporación del ácido mevalónico ($1-^{14}\text{C}$ y $2-^{14}\text{C}$) por extractos de Agave americana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Granada.
158. - ROGERS L., SHAH S.P.J. and GOODWIN T.W. 1965. Intracellular localization of mevalonic kinase in germination seedlings, its importance in the regulation of terpenoid biosynthesis. *Phytochem.* 13, 1419-1421.
159. - ROGERS L.J., SHAH S.P.J. y GOODWIN T.W. 1966. Intracellular localization of Mevalonate-Activating Enzymes in plant cells. *Biochem. J.* 99, 381-388.
160. - LOOMIS W.D. and BATAILLE J. 1963. Biosynthesis of terpenes. III. Mevalonic acid kinase from higher plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 67, 54-63.
161. - GOMEZ-CAPILLA J.A., MACARULLA J.M., MARITIN A., y OSORIO C. 1975. Evolución de los lípidos hepáticos durante el período embrionario y postnatal del Gallus domesticus. *Rev. Esp. Fisiol.* 31, 177-182.
162. - DEUEL J.J. 1955. "The Lipids" Interscience Pub. Co. New York.
163. - GARCIA MARTINEZ J. 1978. Characterization of mevalonate activating enzymes in the neonatal chick liver. *Camp. Biochem. Physiol.* (en prensa).

