

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

COLESTEROGENESIS A PARTIR  
DE ACETATO EN Gallus domesticus.  
INFLUENCIA DE LAS ALTERACIONES DEL  
ESTADO NORMOTIROIDEO EN COMPARACION  
CON EL METABOLISMO  
DEL MEVALONATO

VICTOR ALBERTO ARCE FRAILE

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

1987



Biblioteca Universitaria de Granada



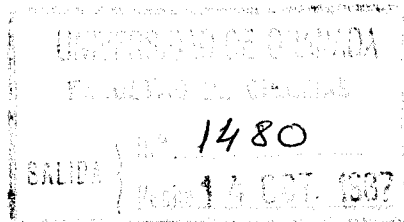
01533602

T  
13  
1

16/3

R. 33.569

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**COLESTEROGENESIS A PARTIR  
DE ACETATO EN Gallus domesticus.  
INFLUENCIA DE LAS ALTERACIONES DEL  
ESTADO NORMOTIROIDEO EN COMPARACION  
CON EL METABOLISMO  
DEL MEVALONATO**

**VICTOR ALBERTO ARCE FRAILE**

**TESIS DOCTORAL**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**1987**



Tesis Doctoral dirigida por los Prof. Drs.  
D. Eduardo García Peregrín, Catedrático del Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y D<sup>a</sup>  
Ana Linares Gil, Titular de dicho Departamento.

Fue leída y defendida el día 25 de Septiembre de  
1987 ante el Tribunal constituido por los Prof. Drs. D<sup>a</sup>  
M<sup>a</sup> Dolores Suárez Ortega (Universidad de Granada), D. Manuel  
Benito de las Heras (Universidad Complutense de Madrid), D.  
Antonio Rios Guadix (Universidad de Granada), D. Juan José Lázaro  
Paniagua (C.S.I.C.) y D. Hilario Ramírez Rodrigo (Universidad de  
Granada).

Obtuvo por unanimidad la máxima calificación de  
APTO "CUM LAUDE".

"Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar..."

A. Machado

Al término de la presente Memoria, y analizando las circunstancias en que ha tenido que llevarse a cabo, no encuentro palabras suficientes para agradecer la ayuda, la comprensión y el estímulo que he recibido de tantos hombres y mujeres con quienes he tenido el don privilegiado de convivir.

Vaya pues, por delante, mi reconocimiento más sincero y profundo de tan encomiable labor.

Citaré en primer lugar a los directores del trabajo, Drs. D. Eduardo García Peregrín y D<sup>a</sup> Ana Linares Gil, quienes con su gran preparación y esfuerzo material y moral han conseguido que "la obra llegue a buen puerto" tras no pocas dificultades e inconvenientes.

A la Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Suárez Ortega, actual Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de quien siempre recibí amables consejos, además de completas lecciones teóricas y prácticas referentes a esta disciplina de la Ciencia.

Al Dr. D. Fermín Sánchez de Medina, melómano empedernido, de cuyas aficiones al canto y declamación quedé sin duda plenamente convencido, y bajo cuya "batuta orquestal" se encontraba el

Departamento cuando accedí a él.

De manera muy especial a mi querido y entrañable colega Dr. D. Juan Antonio Aguilera, compañero de viaje de tantas horas -diurnas y nocturnas- y en las que pude comprobar su enorme capacidad profesional y, sobre todo humana, para resolver con éxito cuantas incógnitas plantea la vida misma.

Vaya asimismo mi agradecimiento a Guillermo Caamaño, compañero y amigo dotado de una exquisita "sensibilidad informática", y a quien tantas molestias ocasioné durante el aprendizaje del manejo del ordenador. También quiero recordar a Juan García, Felipe Rodríguez, Virginia García y Juan Antonio Enríquez, por su ayuda eficaz y desinteresada en las distintas técnicas experimentales ensayadas.

A todos los demás profesores del Departamento, sin excepción, de quienes en todo momento obtuve la palabra de aliento oportuna y necesaria que me permitió comprobar que uno no está solo.

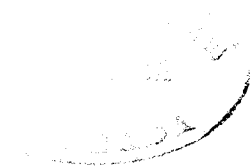
No quisiera olvidar a los Drs. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Angeles Ferro y D<sup>a</sup> Julia Sánchez, por sus medidas de muestras radiactivas y de radioinmunoensayo, así como al Dr. D. Jorge Bolaños por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los datos experimentales.

Asimismo, agradezco al personal auxiliar y técnico del Departamento los servicios

burocráticos, de limpieza de material y de determinación de proteínas, realizados en todo momento con constancia y ejemplaridad.

Un grato recuerdo para D. Francisco Montero, conserje de la Facultad y persona cordialísima, dotado de infinita paciencia para aguardar unos minutos antes de cerrar la puerta de acceso.

A todos ellos, y algún otro que haya podido olvidar inconscientemente, muchas gracias por todo cuando ya no creía en nada.



A mi mujer y mis hijos

A mis padres



ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
dpm	Desintegraciones por minuto
E.E.	Error estándar de la media
HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
Ip-PP	Isopentenil 5-pirofosfato
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
μCi	Microcurio (2.22 x 10 <sup>6</sup> dpm)
MVA	Mevalonato
NADP	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH	Forma reducida del NADP
PMVA	Mevalonato 5-fosfato
PPMVA	Mevalonato 5-pirofosfato
POPOP	2,2'-p-fenilén bis-(5-feniloxazol)
PPO	2,5-difeniloxazol
PTU	6-n-propil-2-tiouracilo
R <sub>f</sub>	Relación de frentes
RIA	Radioinmunoensayo (Técnica del)
L-T <sub>3</sub>	3,5,3'-triiodo-L-tironina
L-T <sub>4</sub>	3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

**INDICE**

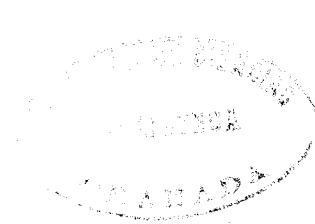
I. INTRODUCCION .....	29
II. ANTECEDENTES .....	37
A. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL .....	39
A.1. RUTA METABOLICA .....	42
A.2. DESVIO DEL MEVALONATO .....	48
A.3. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL A PARTIR DE ACETATO Y MEVALONATO. ALGUNOS ASPECTOS DE SU REGULACION....	55
A.4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS .....	63
A.5. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN POLLO .....	66
B. REGULACION HORMONAL DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL ..	73
B.1. HORMONAS TIROIDEAS. METABOLISMO Y ACCION .....	78
B.1.a. Origen y química .....	78
B.1.b. Biosíntesis .....	80
B.1.c. Absorción y distribución .....	82
B.1.d. Destino y excreción .....	84
B.1.e. Acción fisiológica .....	84

B.1.f. Mecanismo de acción .....	86
B.2. INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO .....	89
B.3. INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA COLESTEROGENESIS .....	90
III. PLAN DE TRABAJO .....	97
IV. MATERIAL Y METODOS .....	101
A. MATERIAL .....	103
A.1. ANIMALES .....	105
A.1.a. Condiciones de mantenimiento .....	105
A.2. INSTRUMENTACION .....	107
A.3. REACTIVOS .....	109
B. METODOS .....	111
B.1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	113
B.1.a. Metabolismo del acetato y mevalonato: incorporación a lípidos insaponificables y producción de CO <sub>2</sub> .....	113

B.1.a.1.	Preparación de los sustratos radiactivos y del estándar interno ..	113
B.1.a.2.	Administración de los sustratos .....	114
B.1.a.3.	Descripción de la "unidad metabólica"	115
B.1.a.4.	Recogida y medida del $^{14}\text{CO}_2$ espirado	117
B.1.a.5.	Extracción de los lípidos insaponificables totales. Medida de su radiactividad .....	118
B.1.a.6.	Fraccionamiento de los lípidos insaponificables. Medida de la radiactividad de las distintas fracciones .....	120
B.2.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	124
B.2.a.	Metabolismo del acetato y mevalonato: incorporación a lípidos insaponificables y producción de $\text{CO}_2$ .....	124
B.2.a.1.	Preparación de los sustratos marcados y del estándar interno .....	124
B.2.a.2.	Obtención del tampón de incubación ..	125
B.2.a.3.	Preparación de las muestras tisulares	125
B.2.a.4.	Procedimiento de incubación .....	126
B.2.a.5.	Recogida y medida del $^{14}\text{CO}_2$ .....	127
B.2.a.6.	Aislamiento de los lípidos insaponificables totales. Medida de su radiactividad .....	128
B.2.a.7.	Fraccionamiento de los lípidos insaponificables. Evaluación de la radiactividad de las fracciones .....	129
B.2.b.	Actividad HMG CoA reductasa .....	129
B.2.b.1.	Preparación del sustrato marcado y	

del estándar interno .....	129
B.2.b.2. Determinación de la actividad .....	130
B.2.c. Actividad PPMVA descarboxilasa .....	131
B.2.c.1. Obtención del sustrato radiactivo ...	131
B.2.c.2. Método de determinación .....	132
B.3. ESTUDIOS SOBRE LA FUNCION TIROIDEA .....	134
B.3.a. Alteraciones del estado normotiroideo: tratamientos ensayados .....	134
B.3.a.1. Selección y marcado de los animales .	134
B.3.a.2. Obtención de los distintos preparados	134
B.3.a.3. Administración de los preparados ....	136
B.3.b. Determinación de los niveles de hormonas tiroideas circulantes .....	137
B.3.b.1. Extracción de las muestras .....	138
B.3.b.2. Procedimiento de medida .....	138
B.4. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	141
V. RESULTADOS Y DISCUSION .....	145
A. EXPERIENCIAS <i>IN VIVO</i> .....	147

A.1. ESTUDIO DETALLADO DEL METABOLISMO DEL ACETATO EN HIGADO, MUCOSA DUODENAL, RIÑON Y CEREBRO .....	149
A.1.a. Producción de CO <sub>2</sub> .....	149
A.1.a.1. Efecto de la dosis de acetato .....	149
A.1.a.2. Efecto del tiempo .....	152
A.1.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales .....	152
A.1.b.1. Efecto de la dosis de acetato .....	152
A.1.b.2. Efecto del tiempo .....	160
A.1.c. Incorporación a las distintas fracciones insaponificables .....	160
A.1.c.1. Efecto de la dosis de acetato .....	164
A.1.c.2. Efecto del tiempo .....	171
A.2. EVOLUCION DIURNA DEL METABOLISMO DEL ACETATO ....	184
A.2.a. Producción de CO <sub>2</sub> .....	185
A.2.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales .....	189
A.2.c. Incorporación a las distintas fracciones de insaponificables .....	194
A.3. CONTRIBUCION RELATIVA DE LOS DIFERENTES TEJIDOS AL METABOLISMO DEL ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES TOTALES .....	204





B. EXPERIENCIAS <i>IN VITRO</i> .....	207
B.1. ESTUDIO DETALLADO DEL METABOLISMO DEL ACETATO EN CORTES DE HIGADO Y RIÑON Y EN RASPADO DE MUCOSA DUODENAL .....	209
B.1.a. Producción de CO <sub>2</sub> .....	209
B.1.a.1. Efecto del peso de tejido .....	209
B.1.a.2. Efecto de la concentración de acetato	210
B.1.a.3. Efecto del tiempo de incubación .....	210
B.1.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales .....	216
B.1.b.1. Efecto del peso de tejido .....	216
B.1.b.2. Efecto de la concentración de acetato	216
B.1.b.3. Efecto del tiempo de incubación .....	221
B.1.c. Incorporación a las distintas fracciones insaponificables .....	227
B.1.c.1. Efecto de la concentración de acetato	227
B.1.c.2. Efecto del tiempo de incubación .....	230
C. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO .....	243
C.1. TRATAMIENTO CON PTU .....	246
C.1.a. Experiencias <i>in vitro</i> .....	246
C.1.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del	

hígado y de los riñones .....	246
C.1.a.2. Efecto sobre los niveles séricos de T <sub>3</sub> y T <sub>4</sub> .....	248
C.1.a.3. Efecto sobre el metabolismo del acetato .....	248
C.1.a.4. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato .....	252
C.1.b. Experiencias <i>in vivo</i> .....	254
C.1.b.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones .....	254
C.1.b.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato .....	256
C.1.b.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato .....	256
C.2. TRATAMIENTO CON T <sub>4</sub> .....	260
C.2.a. Experiencias <i>in vitro</i> .....	260
C.2.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones .....	260
C.2.a.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato .....	260
C.2.a.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato .....	264
C.2.b. Experiencias <i>in vivo</i> .....	265
C.2.b.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones .....	265
C.2.b.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato .....	268

C.2.b.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato .....	268
C.2.c. Estudios a nivel enzimático .....	271
C.2.c.1. Efecto sobre la actividad HMG CoA reductasa .....	271
C.2.c.2. Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa .....	274
C.3. TRATAMIENTO CON T <sub>3</sub> .....	276
C.3.a. Experiencias <i>in vitro</i> .....	276
C.3.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones .....	276
C.3.a.2. Efecto sobre los niveles séricos de T <sub>3</sub> y T <sub>4</sub> .....	278
C.3.a.3. Efecto sobre el metabolismo del acetato .....	280
C.3.a.4. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato .....	282
C.3.b. Estudios a nivel enzimático .....	284
C.3.b.1. Efecto sobre la HMG CoA reductasa ...	284
VI. CONCLUSIONES .....	289
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	299

I. INTRODUCCION



La elevada tasa de mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares, así como el hecho comprobado de que las dos terceras partes de las mismas se deben a obstrucciones coronarias por depósito de placas ateroscleróticas cuyo principal componente es el colesterol, son los motivos principales para un conocimiento exhaustivo de la colesterogénesis y lo que es más importante, su regulación.

Existen estudios que confirman una correlación positiva de los trastornos coronarios y el estado hipercolesterolémico . En la enfermedad de tipo hereditario denominada hipercolesterolemia familiar, no es operativo el mecanismo de inhibición "feedback" por el colesterol de la dieta, lo cual parece sugerir la existencia de algún tipo de regulación de la colesterogénesis distinto al mediado por su producto final.

Efectivamente, se han descrito un gran número de factores que tienen influencia en la biosíntesis de colesterol , entre los que se encuentran algunas hormonas. Sería muy importante, desde un punto de vista terapéutico, demostrar la existencia de algún medio de regulación de la colesterogénesis que no estuviese implicado en el control "feedback", puesto que al ser éste un mecanismo autorregulador contribuye al mantenimiento de un nivel relativamente constante de colesterol. Sin embargo, podría acontecer una disminución importante de la tasa de colesterol si un agente -tal como una hormona- no actuase mediante aquella vía.

La demostración de que la enzima HMG CoA reductasa es el punto clave en la regulación del proceso de síntesis, posibilita que la mayor parte de los estudios recientes se lleven a cabo sobre dicha enzima, comprobándose por otra parte que cambios en la tasa de colesterogénesis conllevan otros paralelos en la actividad reductasa. Aunque estudios recientes hacen que este concepto haya que utilizarlo con precaución, lo cierto es que la

enzima mejor regulada por lo que se conoce hasta ahora, y por lo tanto la que se toma como índice siempre que se quiere comprobar el papel regulador que cualquier factor puede ejercer sobre la biosíntesis del colesterol, es la HMG CoA reductasa.

Ha sido ampliamente demostrado que bajo condiciones normales, tanto la actividad reductasa como la velocidad de colesterogénesis exhiben un ritmo en su evolución diurna, dependiente del período de ingesta más que del propio ciclo luz-oscuridad. Esta circunstancia sugiere, por tanto, que el factor regulador de dicha variación diurna en la actividad enzimática es de origen endógeno y muy sensible además a alguna señal ambiental periódica. De hecho, es muy posible la existencia de un mecanismo regulador que implique una o varias hormonas, aunque se demuestra que dicho ritmo diurno no está controlado por el contenido de serotonina o melatonina de la glándula pineal.

Los primeros estudios acerca del efecto hormonal sobre la síntesis de colesterol se llevaron a cabo a principio de la década de los 50. En aquel momento, la disponibilidad de  $^{14}\text{C}$  permitió el seguimiento de un compuesto a través de una ruta metabólica. La demostración de que el acetato actúa como fuente de todos los carbonos que componen la molécula de colesterol, así como que éste puede ser sintetizado en condiciones *in vivo* o *in vitro*, constituyó el escenario para la determinación de los efectos hormonales sobre la conversión de  $[^{14}\text{C}]$ acetato en colesterol. Las primeras experiencias se realizaron con animales completos, órganos perfundidos o cortes tisulares. También se demostró la incorporación de acetato marcado a colesterol por homogenados de hígado de rata, lo que determinó que muchos de los trabajos que se llevaron a cabo sobre regulación hormonal utilizaran dicha muestra biológica.

La determinación de un rápido método radiactivo de la actividad HMG CoA reductasa, así como la solubilización y

purificación parcial de dicha enzima microsomal, ha hecho de dicha medida la más empleada en los estudios con hormonas. Se han utilizado cultivos de fibroblastos humanos en numerosas ocasiones para estudiar la regulación del metabolismo de lípidos y lipoproteínas, y han sido especialmente útiles para establecer la ruta del receptor de LDL y las anormalidades en las familias hipercolesterolémicas. Sin embargo, se está reconociendo la necesidad de definir bien un medio de cultivo artificial para las células, ya que la preparación de los sueros deficientes de lípidos o lipoproteínas usados en la preincubación de las células para inducir los receptores y la síntesis de lípidos antes del ensayo, puede introducir artefactos. La presencia en el suero de hormonas y factores de crecimiento en concentraciones variables también complica el estudio de sus efectos en el metabolismo lipídico. Así, se han encontrado estímulos en la incorporación de acetato a colesterol no coordinados con un incremento en la actividad HMG CoA reductasa. El bloqueo de la coordinación en la respuesta entre estos dos parámetros en células preincubadas en medio artificial, no se pudo explicar por:

a) estimulación de un paso posterior al mevalonato medido por incorporación de mevalonato a colesterol

b) inactivación *in vitro* de la HMG CoA reductasa por fosforilación: la incubación de microsomas de fibroblastos con fosfatasa alcalina de E. coli resultó en una reducción de actividad HMG CoA reductasa, en contraste con un incremento en los microsomas hepáticos

c) la presencia de inhibidores de HMG CoA reductasa en los extractos microsomales.

Estos resultados indican que la actividad HMG CoA reductasa no puede ser considerada como el único índice de la síntesis de colesterol, sobre todo en cultivo de células bajo todas las condiciones experimentales estudiadas. Sin embargo, como ya se ha dicho en apartados anteriores, esta enzima cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol. La actividad



reductasa presenta rápidos y grandes cambios en respuesta a las necesidades corporales de colesterol, sus productos y otros metabolitos derivados del mevalonato. Estos cambios son efectuados por dos señales: dieta y hormonas. Quizás el proceso regulador mejor estudiado es el sistema "feedback" mediado por LDL, y se ha demostrado que la reducción de actividad HMG CoA reductasa por LDL es debida a la supresión de la transcripción del gen de la reductasa y a la aceleración en la degradación de la proteína reductasa. Sin embargo, y en contraste con la regulación por LDL, no se sabe casi nada sobre los mecanismos por los que varias hormonas regulan la actividad HMG CoA reductasa. Con respecto a las hormonas pituitarias, se ha demostrado que la actividad reductasa hepática se reduce a niveles muy bajos en ratas hipofisectomizadas. La administración de  $T_3$  a estos animales incrementa la actividad reductasa alrededor de 3 veces por encima del valor normal. La actinomicina D y la cicloheximida bloquean el incremento de la actividad reductasa mediado por la  $T_3$ . Esto sugiere que el efecto de la  $T_3$  se debe a un incremento en la síntesis de ARN y de proteínas. En efecto, la administración de triiodotironina resulta en un gran incremento en actividad HMG CoA reductasa, síntesis de proteínas y de ARNm.

Dada la importancia universalmente reconocida del hígado y de la mucosa duodenal en la síntesis de colesterol en animales, se ha estudiado detenidamente la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales, así como su oxidación a  $CO_2$  y  $H_2O$  para la obtención de energía. Del mismo modo, dada la contribución del riñón al metabolismo del mevalonato -precursor muy utilizado en la colesterogénesis-, ha parecido oportuno el estudio del metabolismo del acetato en este órgano con el fin de establecer las comparaciones oportunas entre los distintos tejidos u órganos del pollo. Por último, de acuerdo con la importancia del colesterol como constituyente de los lípidos del cerebro, y en especial de las vainas de mielina, se ha considerado de interés estudiar el metabolismo del acetato en

condiciones próximas a una activa mielinización.

Por otra parte, y dado que el efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo del colesterol no está del todo claro, existiendo incluso observaciones contradictorias, y teniendo en cuenta la influencia que los distintos niveles de estas hormonas presentan sobre la síntesis y degradación del colesterol, se ha estudiado el efecto del 6-n-propil-2-tiouracilo (PTU), de la 3,5,3'-triiodo-L-tironina (L-T<sub>3</sub>) y de la 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (L-T<sub>4</sub>) sobre el metabolismo del acetato, estableciéndose las correspondientes comparaciones respecto a la utilización del mevalonato como sustrato, tanto para la síntesis de colesterol como de compuestos no esteroídicos.



**II. ANTECEDENTES**



A. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL



Durante los últimos años se han publicado algunas revisiones sobre la biosíntesis de compuestos isoprenoides, como las descritas en el *Methods in Enzymology*, cuyo volumen 110 (1985) recopila los trabajos llevados a cabo sobre los primeros estadios de dicha biosíntesis, así como las condensaciones lineales y reacciones de ciclación de dichos compuestos. Asimismo, en el volumen 111 (1985) se revisan algunos aspectos metodológicos y otros relacionados con el metabolismo de esteroides y algunos isoprenoides.

Otras revisiones relativamente recientes y de gran utilidad son las que se publican en el *Annual Review of Biochemistry* bajo la firma de G.J. Schroepfer Jr. sobre la biosíntesis de esteroides (vol.50, 1981; vol.51, 1982). En la introducción al volumen 51, el autor manifiesta que en el volumen anterior llevó a cabo la revisión de las reacciones enzimáticas implicadas en la síntesis de escualeno y otros isoprenoides en células animales, y discute algunos aspectos de la regulación de dichas reacciones. Ya en el mismo volumen 51, revisa las restantes reacciones hasta la biosíntesis del colesterol "...limitado por el tiempo, el espacio y mi propia capacidad de masoquismo...", principalmente en vertebrados.

El proceso conducente a la biosíntesis del colesterol es uno de los más complejos del metabolismo intermediario. En su elucidación deben destacarse las aportaciones de Bloch así como las de Cornforth y Popjak, quienes demostraron a principios de los años 40 que el esqueleto carbonado de dicha molécula procede completamente del acetato. En efecto, administrando a ratas por vía oral una solución de acetato marcado isotópicamente en ambos carbonos, comprobaron que tanto el núcleo esteroide como la cadena lateral aparecían marcados, siendo aproximadamente iguales los porcentajes de incorporación de cada átomo de carbono del acetato en la molécula de colesterol.

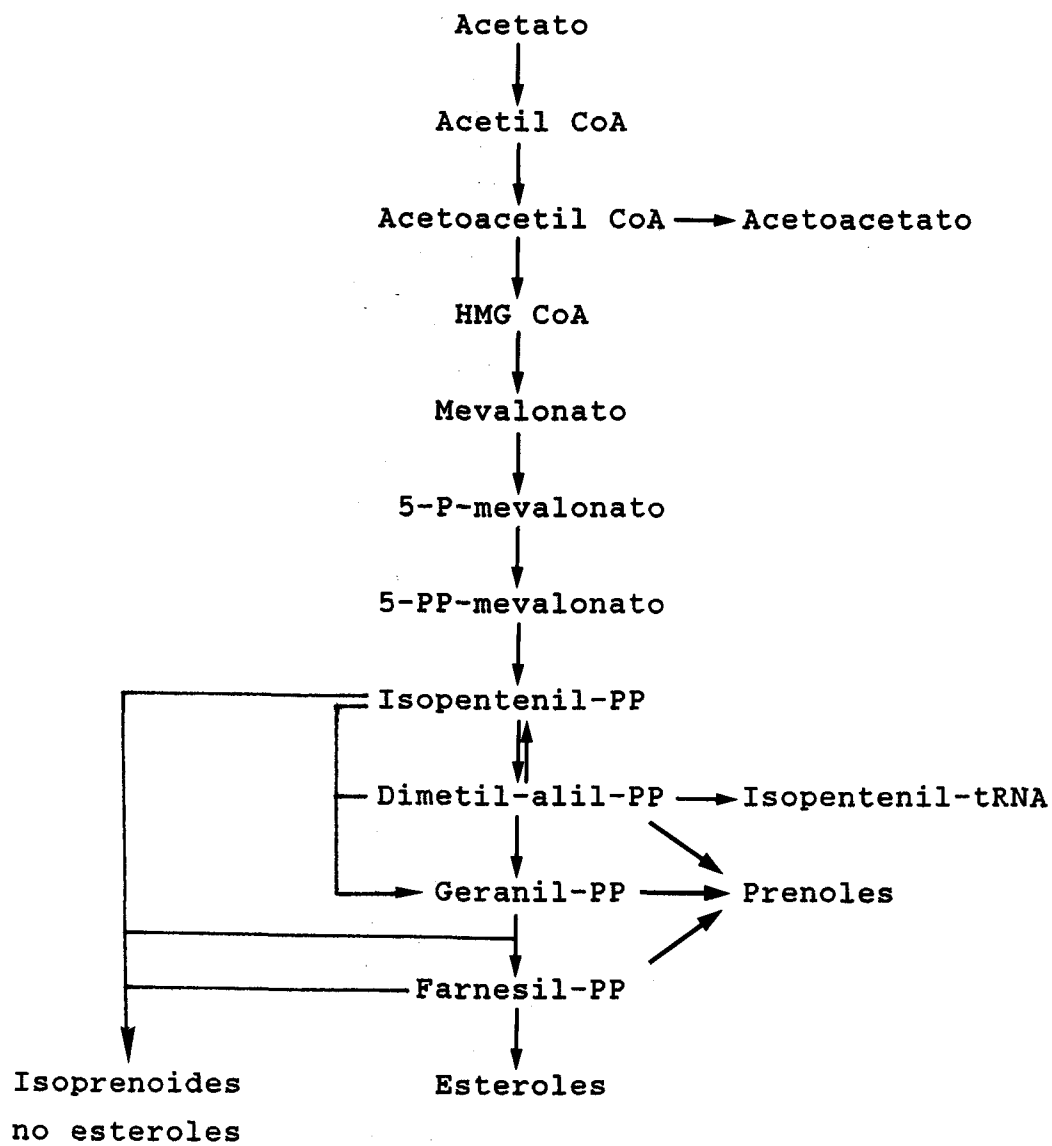


### A.1. RUTA METABOLICA

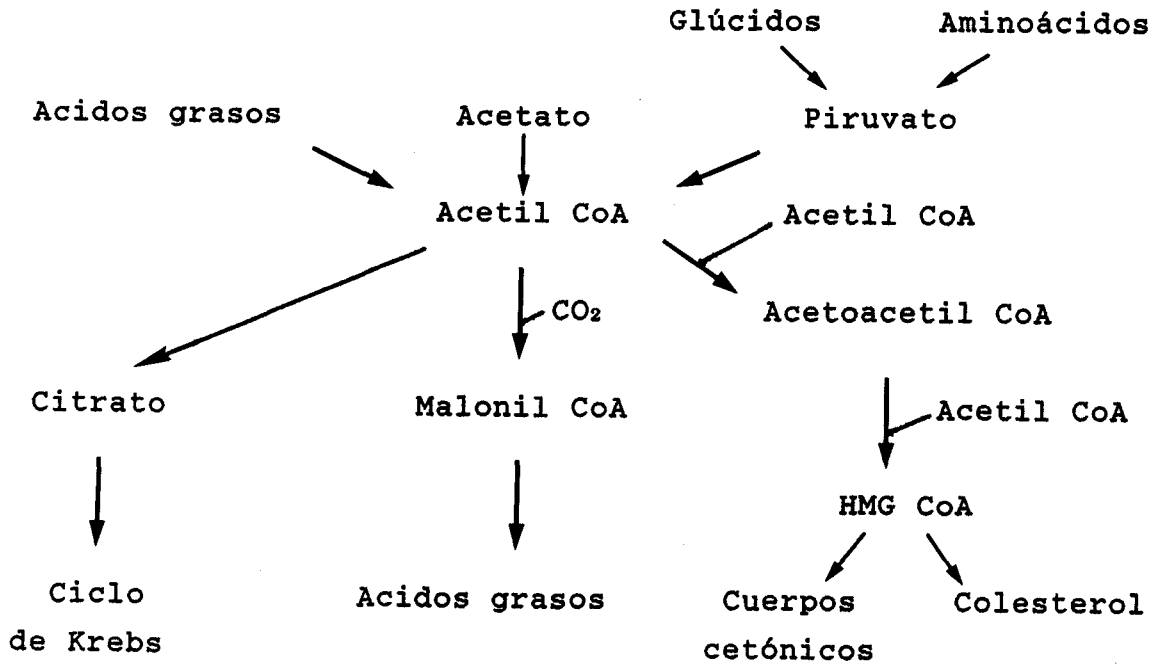
El descubrimiento de la ruta que siguen los carbonos del acetato hasta la formación del isopentenil pirofosfato (Esquema 1), permitió un exámen exhaustivo de los compuestos C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> como posibles precursores de isoprenoides. El descubrimiento del ácido mevalónico como un buen precursor del colesterol (Tavormina y col., 1956) supuso un gran avance en el estudio de las reacciones intermediarias de la biosíntesis de isoprenoides.

La biosíntesis del ácido mevalónico se ha estudiado utilizando sistemas enzimáticos solubles y microsomales-solubles. Actualmente se considera que la primera opción no es muy operativa, ya que durante su obtención ocurre una desorganización de los compartimentos celulares con la consiguiente pérdida de actividad. En la segunda vía -de gran importancia- todos los intermediarios se metabolizan al estado de acil CoA. La primera etapa consiste en la activación del acetato a acetil CoA, reacción catalizada por la acetil CoA sintetasa citoplasmática, aunque dicho producto puede formarse a través de una gran variedad de rutas metabólicas, tales como la oxidación de ácidos grasos o la descarboxilación oxidativa del piruvato (Esquema 2). El acetil CoA es un sustrato común a la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos, que son procesos que acontecen fuera de la mitocondria, por lo que se requiere un mecanismo de regeneración de dicho acetil CoA en el citoplasma constituido principalmente por la denominada "lanzadera del citrato", que actúa a través de la membrana mitocondrial. Esta circunstancia posibilita la existencia de un primer punto de control -aunque no el principal- a nivel de síntesis mitocondrial de citrato y su degradación posterior en el citoplasma (Esquema 3).

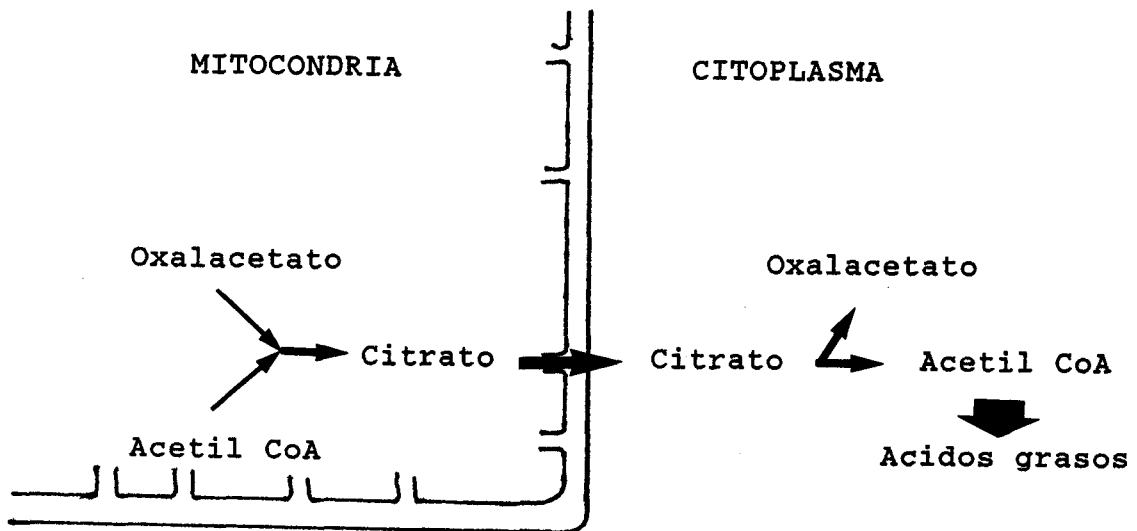
Dos restos de acetil CoA se condensan para formar una molécula de acetoacetil CoA, etapa catalizada por la acetoacetil CoA tiolasa de la fracción microsomal. Bajo condiciones



ESQUEMA 1



ESQUEMA 2



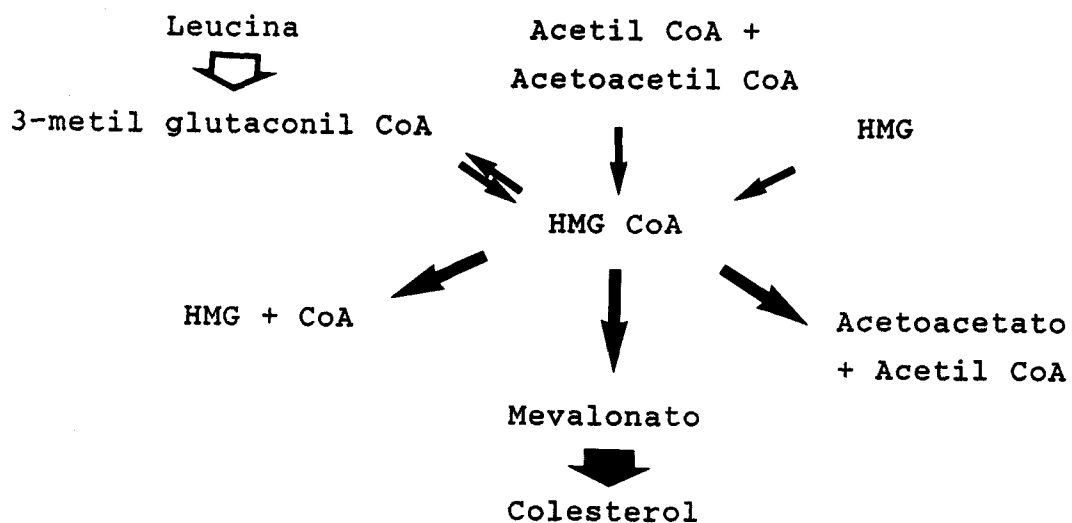
ESQUEMA 3

fisiológicas esta reacción se encuentra muy favorecida ya que su producto es rápidamente utilizado para la síntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA) en una etapa catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintetasa de origen citoplasmático.

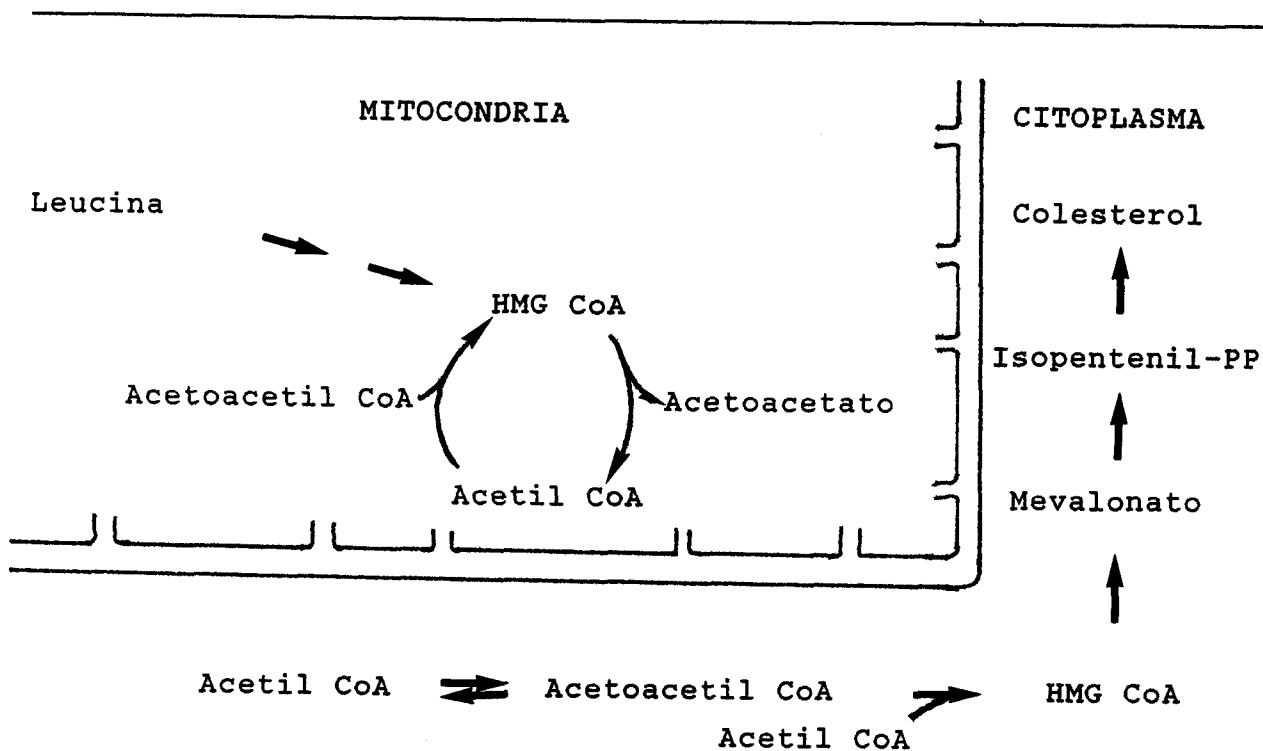
El HMG CoA participa en distintas rutas metabólicas (Esquema 4), una de las cuales es la colesterogénica, donde experimenta una reducción hasta mevalonato (MVA) catalizada por una enzima microsomal de extraordinario interés en la regulación del proceso biosintético global: la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG CoA reductasa). Dicha enzima ha sido intensamente estudiada y constituye el punto principal de control de la ruta objeto de la presente Memoria, habiendo sido su regulación revisada recientemente (Ta-Yam Chang, 1983). También en la regulación de la ruta cetogénica puede intervenir la reductasa debido a la interrelación existente con la vía colesterogénica a nivel de varios intermediarios (Esquema 5).

La conversión de mevalonato a isopentenil pirofosfato (Ip-PP) tiene lugar mediante tres etapas. Las dos primeras son dos fosforilaciones que implican el paso de mevalonato a fosfomevalonato (PMVA) y de éste a pirofosfomevalonato (PPMVA), estando catalizadas por la mevalonato quinasa y fosfomevalonato quinasa, respectivamente. La tercera reacción consiste en una deshidratación seguida de una descarboxilación ATP-dependiente que está catalizada por la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa, mediante las cuales el pirofosfomevalonato es convertido en isopentenil pirofosfato. Evidencias recientes sugieren que este último paso puede constituir también un punto clave en la regulación de la colesterogénesis.

A partir del isopentenil pirofosfato se suceden una serie de isomerizaciones conducentes a la formación de varios pirofosfatos alílicos. Así, en una primera etapa tiene lugar la isomerización del isopentenil pirofosfato a un derivado alílico:



ESQUEMA 4



ESQUEMA 5

el dimetil alil pirofosfato, reacción catalizada por la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa. Posteriormente, se produce una condensación cabeza-cola entre el isopentenil pirofosfato y su isómero para rendir geranil pirofosfato, catalizada por la dimetil alil transferasa. El geranil pirofosfato se condensa con otro resto de dimetil alil pirofosfato en una reacción análoga a la anterior, para dar lugar al farnesil pirofosfato, que está catalizada por una prenil transferasa citoplasmática denominada geranil transferasa. En la siguiente etapa ocurre la condensación cabeza-cabeza de dos restos de farnesil pirofosfato seguida de una reducción en presencia de NADPH, lo que posibilita la formación de escualeno. Ambas reacciones están catalizadas por el sistema enzimático de la escualeno sintetasa de localización microsomal (Beytia y Porter, 1976).

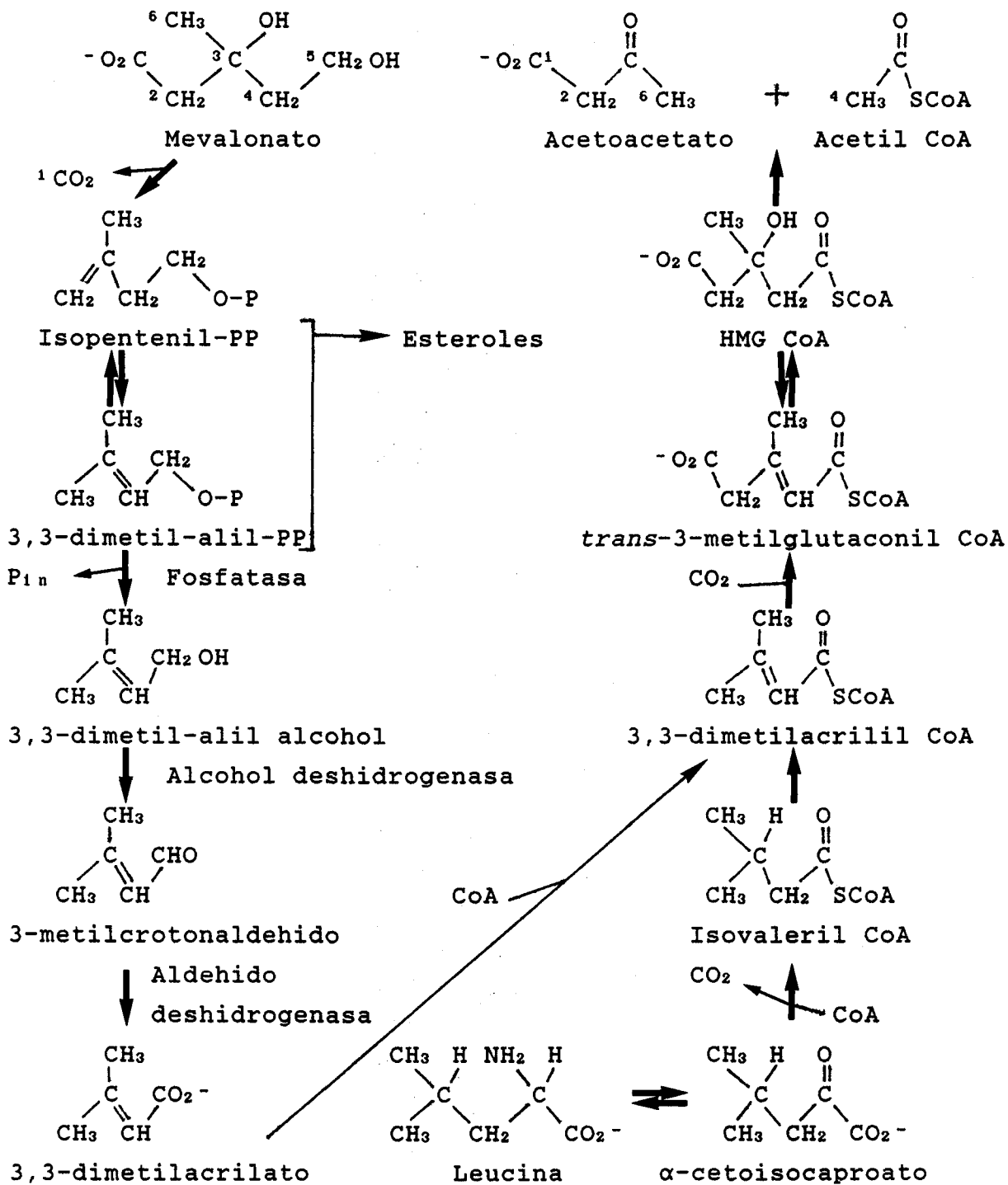
El escualeno es convertido en lanosterol gracias a la actuación de un complejo enzimático microsomal denominado escualeno oxidociclasa que cataliza dos etapas distintas. En la primera tiene lugar la formación de un epóxido (2,3-epóxido de escualeno) en presencia de NADPH, estando catalizada por una epoxidasa o monooxigenasa, componente de dicho complejo. Dicho epóxido experimenta una ciclación catalizada por una ciclasa que también forma parte del sistema enzimático: la lanosterol ciclasa. A partir del lanosterol se sintetizan varios intermediarios mediante una serie de etapas que implican la pérdida del grupo metilo en posición 14, la de otros dos metilos en posición 4, el desplazamiento de un doble enlace desde la posición 8 a la posición 5 y la reducción del doble enlace en posición 24 de la cadena lateral. Este último paso conduce a la formación del colesterol. Johnson y Shah (1974) han realizado un estudio comparativo de la biosíntesis de colesterol a partir de escualeno, lanosterol y algún otro intermediario en la fracción microsomal de hígado, riñón, cerebro y corazón.

## A.2. DESVIO DEL MEVALONATO

Popjak (1970) propuso un desvío de los carbonos de la ruta esterologénica a nivel de los prenoles pirofosfato, postulando que podría representar un mecanismo adicional de control de dicha ruta, estableciéndose además la existencia de una vía que enlazaba la biosíntesis del colesterol y el catabolismo de la leucina (Esquema 6). Dicha hipótesis se basaba en la identificación de [ $^{14}\text{C}$ ]ácidos prenoicos (3,3-dimetil acrílico, geranoico y farnesoico) en tejidos de ratas inyectadas con [ $^{14}\text{C}$ ]mevalonato (Popjak y Cornforth, 1960). Se postuló que los correspondientes prenil pirofosfato (3,3-dimetil alil pirofosfato, geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato) sintetizados a partir del mevalonato -e intermediarios en la biosíntesis del colesterol-, se hidrolizan por una fosfatasa microsomal para rendir los prenoles respectivos (3,3-dimetil alil alcohol, geraniol y farnesol), que son posteriormente oxidados a prenoatos mediante la acción de una alcohol deshidrogenasa y una aldehído deshidrogenasa. El 3,3-dimetil acrilato se activa a 3,3-dimetil acrilil CoA -intermediario de la ruta degradativa de la leucina- para rendir en último término acetoacetato y acetil CoA, vía HMG CoA.

Según el esquema propuesto, el C1 del mevalonato se desprende como  $\text{CO}_2$  a nivel de la PPMVA descarboxilasa, el C2, C3 y C6 del mevalonato pasan a constituir respectivamente el C2, C3 y C4 del acetoacetato, y el C4 y C5 de dicho mevalonato ocupan las posiciones C2 y C1 del acetil CoA.

Existen datos experimentales que apoyan la existencia de un desvío del mevalonato, pero no son concluyentes a la hora de establecer que tenga lugar precisamente a nivel del dimetil alil pirofosfato, sobre todo si se tiene en cuenta los resultados en los que Popjak basó su hipótesis (Popjak y Cornforth, 1960) y que hacían del farnesoico el ácido prenoico sintetizado en mayor



ESQUEMA 6



proporción. A primera vista, puede resultar sorprendente el que Popjak considerase al dimetil alil pirofosfato como punto de desvío, pero puede interpretarse teniendo en cuenta su pretensión de hallar alguna etapa donde llevar a cabo una inhibición -por determinados fármacos- de la síntesis endógena del colesterol. Las prenil transferasas constituyeron dicho punto que, por otra parte, coincidió con que el acúmulo de dimetil alil pirofosfato siguiese ese desvío en su metabolismo.

Otros resultados apoyan la existencia del desvío tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Efectivamente, la administración de mevalonato marcado en todos los carbonos excepto en el C1, origina la aparición de radiactividad en el acetil CoA, cuerpos cetónicos y productos de su metabolismo. De esta manera, la inyección de [2-<sup>14</sup>C]mevalonato en ratas normales posibilita la recuperación de una cantidad significativa de [<sup>14</sup>C]palmitato, sobre todo a nivel de cerebro, médula espinal y piel (Edmond y Popjak, 1974), lo que por otra parte evidencia una mayor actividad del desvío en tejidos de origen ectodérmico. Asimismo, Edmond y col. (1975) demuestran que la inyección de mevalonato marcado en el C2 o C5 en rata, determina la aparición de radiactividad en el 3-hidroxi butirato sanguíneo, y Fogelman y col. (1975) encuentran que más del 12% de la radiactividad del [5-<sup>14</sup>C]mevalonato inyectado a ratas y humanos se aísla como <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de los últimos trabajos realizados *in vitro* sobre el desvío del mevalonato (reproducción del *Methods in Enzymology* vol. 110, pp. 112-113).

Desde hace aproximadamente 10 años se han llevado a cabo en este Departamento numerosos trabajos -la mayor parte de ellos publicados- acerca del metabolismo del mevalonato en pollo. Los primeros estudios se centraron en las variaciones del metabolismo del mevalonato durante el desarrollo perinatal de dicho animal, y permitieron establecer los patrones de desarrollo de distintas enzimas (Linares y col., 1980) así como su papel en la regulación

QUANTITATIONS OF MEVALONATE METABOLISM VIA THE SHUNT PATHWAY IN TISSUE *in Vitro*

Preparation	Labeled mevalonate; <i>R</i> -isomer concentration	Product(s) assayed	Conclusions from references
Slices rat tissues	2- <sup>14</sup> C,5- <sup>14</sup> C; 0.05 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL; long chain fatty acids	Shunt significant in kidney, ileum, spleen, lung, testes; minor or undetectable in liver, brain, skin, adipose tissue; kidney 21 times more active than any other tissue per unit weight <sup>a</sup>
Slices calf tissues, calf villi and crypt cells	2- <sup>14</sup> C; 4.2 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL	Shunt in kidney cortex 15-80 times more active than ileum, muscle, kidney medula, liver; not detected in adipose tissue <sup>b</sup>
Slices liver chick	2- <sup>14</sup> C; 0.02-4.0 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL	13-20% of metabolism in kidney via shunt at 0.05-4.0 mM; 5% at 0.04 mM; quantitatively insignificant in liver <sup>c</sup>
Rat villous cells	1- <sup>14</sup> C,2- <sup>14</sup> C; 0.25 mM	CO <sub>2</sub>	Suggest shunt absent in intestinal epithelial cells <sup>d</sup>
Slices liver and kidney from normal and diabetic rats treated and untreated with insulin	5- <sup>14</sup> C; 0.05 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL	Shunt decreased in liver and kidney in diabetes; insulin restores activity <sup>e</sup>
Slices liver and kidney of normal rats and rats in diabetic ketosis	1- <sup>14</sup> C,2- <sup>14</sup> C, 5- <sup>14</sup> C, 5- <sup>3</sup> H; 0.05 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL	Shunt greater in kidney than liver; no difference between normal and diabetic <sup>f</sup>
Slices of kidney from male and female rats	5- <sup>14</sup> C; 0.05 mM	CO <sub>2</sub>	Kidney slices from female form <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> at more than twice the male rate <sup>g</sup>



QUANTITATIONS OF MEVALONATE METABOLISM VIA THE SHUNT PATHWAY IN TISSUE *in Vitro* (continued)

Preparation	Labeled mevalonate; R-isomer concentration	Product(s) assayed	Conclusions from references
Slices liver and kidney from male and female hyper- and hypothyroid rats	5- <sup>14</sup> C; 0.07 mM	CO <sub>2</sub> ; NSL	Thyroid hormone status changes produce only minor change in shunt activity in liver and kidney; kidney slices from female and male form <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> at same rate <sup>b</sup>
Cultured human lymphocytes	2- <sup>14</sup> C; 0.07 mM	NSL; fatty acids	Shunt (incorporation into fatty acids + neutral alphatic components) 20-31% of total metabolism (total radioactivity incorporated) <sup>i</sup>
Perfused rat kidneys	2- <sup>14</sup> C, 4,5- <sup>14</sup> C, 5- <sup>14</sup> C, 5- <sup>3</sup> H; 250 nM	Ketone bodies; fatty acids; CO <sub>2</sub> ; NSL.	Shunt activity higher in kidney from female than male rats; metabolism by shunt as much as 1/5 that by sterol-forming pathway <sup>j</sup>
Perfused rat livers	2- <sup>14</sup> C, 3- <sup>14</sup> C, 4,5- <sup>14</sup> C, 5- <sup>14</sup> C; 215-380 nM	CO <sub>2</sub> ; ketone bodies; fatty acids; NSL	Shunt accounts for about 5% of mevalonate metabolism in liver <sup>k</sup>

<sup>a</sup> M. Righetti, M. H. Wiley, P. A. Murrill, and M. D. Siperstein, *J. Biol. Chem.* **251**, 2716 (1976).

<sup>b</sup> J. R. Linder and D. C. Beitz, *J. Lipid Res.* **19**, 836 (1978).

<sup>c</sup> J. A. Aguilera, A. Linares, V. Arce, and E. García-Peregrín, *Comp. Biochem. Biophys.*, **B 71B**, 617 (1982).

<sup>d</sup> F. Malki, K. Badjakian, and I. F. Durr, *Int. J. Biochem.* **13**, 187 (1981).

<sup>e</sup> M. H. Wiley, K. R. Feingold, M. M. Howton, and M. D. Siperstein, *Diabetologia* **22**, 118 (1982).

<sup>f</sup> P. S. Brady, W. C. Schumann, S. Ohgaku, R. F. Scofield, and B. R. Landau, *J. Lipid Res.* **23**, 1317 (1982).

<sup>g</sup> M. H. Wiley, M. M. Howton, and M. D. Siperstein, *J. Biol. Chem.* **254**, 837 (1979).

<sup>h</sup> K. R. Feingold, M. H. Wiley, G. MacRae, and M. D. Siperstein, *J. Clin. Invest.* **66**, 646 (1980).

<sup>i</sup> C. Tabacik, S. Aliau, B. Serrou, and A. C. de Paulet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1987 (1981).

<sup>j</sup> R. R. Kopito, D. M. Murray, D. L. Story, and H. Brunengraber, *J. Biol. Chem.* **259**, 372 (1984).

<sup>k</sup> S. B. Weinstock, R. R. Kopito, G. Endemann, J. F. Tomera, E. Marinier, and D. M. Murray, *J. Biol. Chem.* **259**, 8944 (1984).

de la colesterogénesis (Alejandre y col., 1983). La información obtenida tanto *in vitro* como *in vivo* permitió tener una visión bastante completa de la contribución relativa de cada órgano a la síntesis y movilización de colesterol en el organismo durante las primeras semanas tras la eclosión (Aguilera y col., 1982; Aguilera y col., 1983; Linares y col., 1983; Aguilera y col., 1984).

Estos estudios previos en torno al metabolismo del mevalonato condujeron a la caracterización de la ruta del desvío en distintos órganos, su contribución al metabolismo total de dicho compuesto (Aguilera y col., 1984; González-Pacanowska y col., 1985) y sus posibles implicaciones en la regulación de la síntesis de isoprenoides en general, y esteroides en particular.

Dentro de los trabajos efectuados, se establecieron las condiciones óptimas para el estudio del metabolismo del mevalonato tanto *in vitro* como *in vivo*. En experiencias *in vivo* se evaluó la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido en la respiración tras la inyección de (R)-[5- $^{14}\text{C}$ ]mevalonato (Linares y col., 1983) y en circunstancias *in vitro* se midió la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  formado a partir de dicho sustrato por cortes finos de diferentes tejidos. Ambos son métodos indirectos y están basados en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  que resulta de la oxidación del [ $^{14}\text{C}$ ]acetil CoA originado a partir del mevalonato que ingresa en la ruta del desvío.

También se ha cuantificado dicha ruta bajo distintas condiciones fisiológicas a fin de establecer su posible relación con la biosíntesis de compuestos isoprenoides y la elaboración de un esquema global de regulación del proceso. Así, se demostró que en condiciones de inhibición de la síntesis de esteroides y de la actividad HMG CoA reductasa -por ejemplo una dieta rica en colesterol-, tiene lugar una marcada activación del desvío (Aguilera y col., 1984a; Aguilera y col., 1984b).

Brady y col. (1983) aportan una serie de datos que quizás podrían demostrar que el desvío acontece a nivel de los prenoles pentacarbonados, puesto que describe con detalle la distribución de  $^{14}\text{C}$  en el 3-hidroxi-butirato excretado, tras la inyección de mevalonato marcado en sus distintos carbonos. Sin embargo, son aún resultados preliminares que necesitan confirmación, además de estar efectuados sobre ratas diabéticas. Algunos autores asumen que se produce a nivel del dimetil alil pirofosfato según la hipótesis de Popjak, y otros, como Schroepfer (1981) afirman que también podría establecerse e incluso predominar a nivel de geranyl pirofosfato o farnesil pirofosfato. Este autor llega también a proponer una ruta alternativa basada en estudios sobre degeneración de alcoholes alílicos en bacterias (Seubert y Fass, 1964) así como en los de Edmond y Popjak (1974). Por tanto puede concluirse que los estudios llevados a cabo hasta la fecha no definen claramente el o los puntos de desvío, ni la mayoría de los intermediarios de dicha vía.

Además de todos estos trabajos referidos, existen en la actualidad otros que corroboran la existencia del desvío, como los de Havel y col. (1986), Brown y col. (1985) y Watson y col. (1985, 1986), donde encuentran que células  $K_c$  de Drosophila desvían una fracción significativa -más del 40%- del mevalonato hacia el catabolismo oxidativo de poliprenoles posteriores al isopentenil pirofosfato, y por otra parte que el desvío del mevalonato puede desempeñar un papel clave en la regulación de la HMG CoA reductasa por el mevalonato.

A.3. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL A PARTIR DE ACETATO Y MEVALONATO. ALGUNOS ASPECTOS DE SU REGULACION.

Hacia la mitad de la década de los 40, Bloch y col. (1946) demostraron por vez primera que el acetato marcado con deuterio o con  $^{13}\text{C}$  se incorporaba a esteroides precipitables por digitonina en cortes hepáticos de rata, mientras que aparentemente otros tejidos como riñón, intestino, testículos y bazo eran incapaces de llevar a cabo dicha síntesis.

Poco después, Szere y col. (1950) utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]acetato demostraban que este precursor es activamente incorporado en condiciones *in vitro* a esteroides por tejidos tan diversos como intestino, testículos, riñón, piel y cerebro, así como en hígado. Simultáneamente Popjak y Beeckmans (1950) pusieron de manifiesto la colesterogénesis extrahepática en animales intactos. Estos estudios se han confirmado reiteradamente en distintos laboratorios, de forma que puede asegurarse que prácticamente la totalidad de los tejidos de mamíferos son capaces de sintetizar colesterol (Gould y Cook, 1958; Kritchevsky, 1958).

En estudios llevados a cabo en condiciones *in vitro* en rata y mono (Dietschy y Wilson, 1968; Dietschy y Siperstein, 1967), se observa que los mayores niveles de síntesis de esteroides por unidad de peso de tejido ensayado corresponden a hígado e intestino delgado, y dentro de éste sobre todo al íleon, mientras que los más bajos se localizan en músculo y sistema nervioso de animales adultos. La escasa actividad biosintética del cerebro es sólo característica del tejido adulto. Sin embargo, en neonatos la velocidad de incorporación de acetato a esteroides es mucho mayor, llegando a superar incluso los valores encontrados para el hígado.

Cuando la velocidad de incorporación se refiere al

órgano completo, la primacía de hígado e intestino delgado continúa siendo evidente frente al resto de los tejidos considerados. En caso del mono ardilla (Dietschy y Wilson, 1968) se ha estimado en un 82% el aporte del hígado y del tracto gastrointestinal a la actividad biosintética global de colesterol en este primate (74% y 8%, respectivamente). La extrapolación de estos datos obtenidos *in vitro* al animal intacto es problemática. En efecto, mientras que son numerosos los trabajos destinados a evaluar la velocidad de síntesis de esteroides en hígado y en otros tejidos extrahepáticos mediante la incorporación de diferentes precursores radiactivos, no se ha considerado lo suficiente la existencia de gran cantidad de problemas inherentes a este tipo de determinaciones. En efecto, algunos autores señalan que cuando se utilizan sustratos marcados con  $^{14}\text{C}$  en preparaciones de células intactas, existe siempre la posibilidad de subestimar la velocidad de síntesis de esteroides, bien por causa de la entrada de sustrato a la célula, bien porque su metabolismo a acetyl CoA sea limitante o bien porque la actividad específica de dicho sustrato -o la del acetyl CoA generado por él- se diluya excesivamente en el interior celular (Andersen y Dietschy, 1979).

Así pues, a pesar de que la incubación de cortes de tejido con acetato marcado ha constituido la técnica más utilizada hasta el momento en el estudio de la velocidad de colesterogénesis, bien es cierto que se trata de resultados con un valor relativo ya que suministran información muy valiosa, pero debe tenerse en cuenta que la dilución endógena de dicho precursor marcado puede ser significativa. Por otra parte se ha señalado (Dietschy y McGarry, 1974) que además del error asociado a la dilución isotópica intracelular, existe otra limitación adicional con la presencia de un paso parcialmente limitante de su velocidad metabólica, previo a la HMG CoA reductasa: la propia activación del acetato en el citosol. Otros autores han confirmado esta posibilidad indicando que su incorporación a

colesterol y ácidos grasos puede variar independientemente de la incorporación de mevalonato (Grandgeorge y col., 1977).

La incorporación de mevalonato 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 (Kandutsch y Saucier, 1969; Packie y Kandutsch, 1973), en riñón e hígado de hamster, perro y oveja (Gans y col., 1973) y en homogenados de aorta de cerdo (Slakey y col., 1973; Bell, 1976). Edgren y Hellström (1972) observaron que después de la inyección parenteral de [2-<sup>14</sup>C]mevalonato se recoge más radiactividad en riñón que en hígado, y mientras en éste es el colesterol el que aparece mayoritariamente marcado, en el riñón son lanosterol y escualeno los que se sintetizan a mayor velocidad.

Entre todos los factores que intervienen en la regulación de la colesterogénesis, los más estudiados han sido la evolución diurna, el desarrollo y la alimentación.

Back y col. (1969) encontraron que la incorporación de mevalonato a esteroides no varía significativamente entre el mediodía y la medianoche, lo que no coincide con los resultados obtenidos por Hickman y col. (1972). Sin embargo, Bhat y Ramasarma (1977) demostraron la existencia de ritmo en la evolución diurna de la conversión de mevalonato a esteroides que correspondería en realidad al paso de aquél a isopentenil pirofosfato, ya que experiencias paralelas en las que se mide el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> procedente de la descarboxilación del [1-<sup>14</sup>C]mevalonato muestran idénticas variaciones a lo largo del día. Todas estas discrepancias pueden deberse a la utilización de una concentración de sustrato muy superior a los valores de saturación.

En lo que respecta al desarrollo, se ha encontrado en



rata que durante los primeros estadios del mismo -esto es, en la lactancia-, la incorporación de mevalonato a esteroides es mínima, aumentando considerablemente en animales destetados (Shah, 1973). Según esto, la actividad de una o más enzimas de esta vía metabólica se altera a partir del destete del animal, pudiendo actuar como enzimas reguladoras de la propia colesterogénesis en las ratas lactantes y provocar, por tanto, su disminución debido a los niveles de colesterol de la leche materna.

Existen trabajos abundantes y muy variados sobre la influencia de la alimentación en la producción de colesterol. Así, Johnson y Shah (1977) estudian la colesterogénesis a partir de mevalonato en ratas lactantes y destetadas, alimentadas ambas con una dieta de colesterol. Se observa una clara disminución de la síntesis de colesterol en los animales que ingieren dicha dieta. Además, en experiencias con ratas sometidas a ayuno y realimentadas después con dieta normal, se aprecia un incremento de la formación de esteroides después de la ingesta normal, pero que es suprimido en el caso de que sean realimentados con una dieta rica en colesterol.

En otros estudios llevados a cabo por Ramachandran y Shah (1977) se demuestra que la descarboxilación del pirofosfomevalonato es mayor en ratas destetadas que en ratas lactantes, etapa que disminuye fuertemente en animales destetados y alimentados con una dieta suplementada con colesterol. Este hecho parece demostrar que la etapa de formación del isopentenil pirofosfato es limitante en la conversión de mevalonato a esteroides.

Gould y Swyryd (1966) observaron una inhibición de la conversión de mevalonato a colesterol en hígado de ratas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol, inhibición que es total al año de iniciada. También demostraron que la conversión de escualeno a colesterol no disminuye, aunque sí lo

hacen las de farnesil pirofosfato a colesterol y de mevalonato a farnesil pirofosfato. De todas formas, la inhibición observada en la síntesis de colesterol a partir de mevalonato es menor que a partir de acetato. Cuando los animales se someten a una dieta de ácido cólico, la colesterogénesis a partir de mevalonato se inhibe en un 40%, mientras que a partir de acetato lo hace casi totalmente. Sin embargo, Shapiro y Rodwell (1971) describen cómo después de 10 horas de alimentación con una dieta de colesterol, no se afecta la conversión de mevalonato en colesterol.

El ayuno inhibe casi totalmente la formación de colesterol a partir de mevalonato, pero según Slakey y col. (1972) la realimentación con una dieta exenta de grasas aumenta dicha síntesis hasta sus valores normales a las 72 horas.

Asimismo, Raicht y col. (1975) observaron que en ratas inyectadas con mevalonato y alimentadas con colesterol en la dieta, tiene lugar un aumento de la absorción de colesterol y la lógica inhibición de su biosíntesis. Sin embargo, la adición de  $\beta$ -sitosterol a la dieta inhibe totalmente la absorción de colesterol, aumentando ligeramente su síntesis endógena.

Cuando los animales ingieren una dieta normal suplementada con colesterol al 5%, Wiss (1976a) observó una ligera inhibición en la colesterogénesis a partir de mevalonato, incrementando al mismo tiempo la formación de lanosterol y escualeno. También encuentra que dicha colesterogénesis se inhibe con una dieta lipogénica de alto contenido en glucosa -70%-, localizando dicha inhibición entre lanosterol y colesterol (Wiss, 1976b).

Kuroda y Eudo (1977) estudiaron *in vitro* la inhibición de la colesterogénesis por ácidos grasos. En efecto, la incorporación de mevalonato se inhibe por ricinoleato y otros ácidos ramificados en una etapa comprendida entre el escualeno y

el lanosterol. También se observó que el triarimol -inhibidor de la eliminación del metilo en posición 14 del lanosterol- ejerce un potente efecto inhibidor de la colesterogénesis a partir de mevalonato, acumulándose además lanosterol y 24,25-dihidrolanosterol (Mitropoulos y col., 1976).

En la grasa del epidídimo de rata se ha estudiado la incorporación de mevalonato a esteroides, comprobándose que a las 70 horas de ayuno se reduce al 30% respecto de ratas alimentadas (Durr, 1968). Asimismo Durr y Murad (1971) estudian la incorporación de mevalonato por la mucosa duodenal de rata, estando dicho proceso inhibido por los ácidos biliares.

Numerosos investigadores consideran que el principal punto de regulación de la síntesis de isoprenoides es la reducción del HMG CoA a mevalonato, reacción catalizada por la HMG CoA reductasa (EC 1.1.1.34) (Brown y Goldstein, 1980; Ramasarma, 1973; Chang, 1983), aunque esta aseveración debe ser considerada con prudencia, sobre todo después de los últimos estudios acerca del papel regulador de la acetoacetyl CoA sintetasa (Bergstrom y col., 1984) y la HMG CoA sintasa (Clinkenbeard y col., 1974). No obstante, lo cierto es que la enzima mejor regulada por lo que se conoce hasta ahora -y por tanto la más utilizada en los estudios sobre regulación de biosíntesis de isoprenoides- es la HMG CoA reductasa.

Desde que se comprobó que el colesterol de la dieta inhibe paralelamente la colesterogénesis hepática y la actividad HMG CoA reductasa, distintos grupos de trabajo se han dedicado al estudio del mecanismo de regulación "feedback" de dicha enzima. Los resultados más sobresalientes son, por una parte el hecho de que dicha regulación está mediada por lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por el 25-hidroxicolesterol (Brown y Goldstein, 1976; Kandutsch y col., 1978), siendo sus acciones muy similares (Chang y col., 1981; Brown y col., 1975; Chang y Limanek, 1980).

El colesterol muy purificado no afecta a la reductasa (Chen y col., 1979). También destaca el hecho de que la regulación se deba al balance entre la inhibición de la síntesis de la propia enzima (Chang y col., 1981; Brown y col., 1975) y el aumento de su degradación (Chang y col., 1981; Bell y col., 1976), esto es, una regulación por niveles de concentración del biocatalizador. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, el mecanismo molecular por el que el colesterol modula la actividad reductasa permanece aún desconocido.

Pero la regulación de los niveles de HMG CoA reductasa no es sólo dependiente de esteroides. Efectivamente, a partir del mevalonato se sintetizan una serie de compuestos de naturaleza no esteroídica que contienen como unidad básica el isopentenil pirofosfato, a saber: dolicol, ubiquinona e isopentenil adenosina (Brown y Goldstein, 1976). En relación con el control de la síntesis de estos compuestos se ha postulado un mecanismo de regulación multivalente de la reductasa mediado por isoprenoides. Así, se demuestra que la adición de niveles saturantes de LDL a cultivos de fibroblastos incubados con compactina -que es un inhibidor competitivo de la enzima-, determina una disminución en dicha actividad del orden del 85%, siendo casi total cuando se adiciona mevalonato a dicho medio de cultivo. Este efecto inhibitor no se aprecia en presencia de escualeno, ubiquinona o dolicol, pero sí cuando se incuba el tejido con isopentenil adenosina. Por tanto, y a la vista de estos resultados, puede afirmarse que la pérdida de actividad reductasa debida al mevalonato es independiente de la síntesis de compuestos esteroídicos, y parece estar mediada por algún metabolito de naturaleza no esteroídica derivado del mevalonato sobre cuya identificación están orientados gran parte de los trabajos actuales.

De esta manera, y a grandes rasgos, pueden definirse los niveles de regulación de la HMG CoA reductasa: uno, destinado al

control de la formación de esteroides (Gould, 1977), y otro, que responde a las necesidades del mevalonato y/o compuestos derivados no esteroídicos (Blaisdell y Watson, 1981; Erickson y col., 1980).

#### A.4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS

En todo organismo en estado estable cada parte componente presenta un equilibrio dinámico, lo que implica que la suma de los compuestos de entrada es igual a la suma de los compuestos de salida. Existen dos procesos de entrada en caso del colesterol: absorción intestinal del colesterol de la ingesta y biosíntesis endógena (Rittemberg y Schoenheimer, 1937); y otros dos procesos principales de salida: conversión a ácidos biliares (Bloch y col., 1943) y excreción (Chevallier, 1956).

Utilizando técnicas radiactivas y en condiciones *in vitro*, se han experimentado grandes avances en el estudio de la colesterogénesis, aunque las principales evidencias de biosíntesis se encontraron en estudios *in vivo* (Rittemberg y Schoenheimer, 1937).

Desde el punto de vista fisiológico se plantean varias cuestiones: ¿se sintetiza el colesterol en todos los órganos del cuerpo?, ¿a qué velocidad tiene lugar dicha síntesis?, ¿esa velocidad se ajusta de algún modo a la cantidad de colesterol ingerido?.

La respuesta a la primera de las preguntas se encontró en la segunda mitad de la década de los 40, empleando técnicas *in vitro* (Bloch y col., 1946; Szere y col., 1950) y siendo sus resultados repetidamente confirmados (Gould y Cook, 1958; Kritchevsky, 1958).

Respecto a la segunda cuestión, se llevaron a cabo los primeros estudios en los años 50 (Gould y Taylor, 1950), desarrollándose posteriormente con la consecución de notables avances (Siperstein y Fagan, 1964), que permitieron concluir que el hígado es el órgano más importante en la colesterogénesis debido a que es donde se produce la mayor cantidad de colesterol

a partir de distintos precursores (Gould y Cook, 1958; Kritchevsky, 1958). Este hecho ha sido después ampliamente demostrado (Bell y col., 1963; Ganong, 1965).

En el estudio de la biosíntesis del colesterol se plantea el problema de su movilidad en el organismo (Chevallier, 1956a; Chevallier, 1956b; Chevallier, 1967). En efecto, se establecen tránsitos rápidos entre el colesterol del plasma -que constituye el denominado "compartimento central"- y el de los distintos órganos (que constituyen el "compartimento periférico"). Este modelo dinámico propuesto por Mathé y Chevallier (1980) se basa en los datos obtenidos por el método del equilibrio isotópico (Chevallier, 1963).

Acerca de la velocidad a que estos cambios se suceden se conoce poco, aunque puede ser muy rápida como en el caso de los eritrocitos (Hagermann y Gould, 1951; D'Hollander y Chevallier, 1972). En experimentos *in vivo* se demuestra que tras la administración de colesterol marcado, los cambios en la actividad sintética de un órgano tienen lugar según una cinética que depende tanto de la propia síntesis endógena como de los cambios entre ambos compartimentos, "central" y "periférico". Estos estudios cinéticos han permitido definir de forma precisa las características funcionales de la síntesis del colesterol en órganos. No obstante, aún se desconoce realmente la importancia de los distintos órganos -considerados tanto independientemente, como un sistema armónico- en la secreción interna del colesterol, y especialmente el hígado.

En otras experiencias que utilizan dietas de colesterol marcado -lo cual posibilita el seguimiento de su secreción interna- se demuestra la existencia de diferencias notables en el comportamiento *in vivo* e *in vitro*. La técnica del equilibrio isotópico, descrita por vez primera en 1956 (Chevallier), estandarizada en 1966 (Chevallier y Lutton) y revisada en 1972

(Lutton y Chevallier), determina el que puedan abordarse los grandes problemas de la colesterogénesis (Chevallier y Mathé). Así, se demuestra que dietas con distintos porcentajes de colesterol -1:7, 1:40 y 1:130- no provocan alteración alguna de su secreción interna, experimentando incluso una elevación significativa en caso de concentraciones más altas de la dieta. Estos resultados no son iguales a los obtenidos *in vitro*, sobre todo a nivel de regulación en hígado, por lo que puede sugerirse que éste órgano no es el principal responsable de la biosíntesis de colesterol en el organismo o que el mecanismo regulador de la misma es operativo en el hígado, pero no es capaz de controlar el balance total de dicha síntesis.

También se ha demostrado de manera directa (Chevallier y Lutton, 1973; Lutton y Chevallier, 1976) o indirecta (Chevallier y Magot, 1975) que el tracto digestivo -sobre todo intestinal- es responsable de al menos el 56% de la biosíntesis de colesterol en ratas adultas machos.

En este Departamento se han llevado a cabo recientes estudios (Iglesias, 1986 Tesis Doctoral) que permiten sugerir que la importancia relativa del colesterol absorbido, respecto de su síntesis endógena, depende de la zona estudiada, el tipo celular considerado y la dieta empleada. Además, dichos resultados apoyan la existencia de distintos "pools" funcionales de colesterol en enterocitos que responden de distinta manera frente a las diferentes situaciones metabólicas del intestino.



#### A.5. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN POLLO

La mayoría de los estudios bioquímicos que se han llevado a cabo en aves durante los últimos 20 años, están referidos al metabolismo lipídico y glucídico. Gran parte de ellos se realizaron en aves domésticas. En conjunto, las investigaciones demuestran que la mayoría de las vías metabólicas son cualitativamente similares a las de mamíferos, pero existen importantes diferencias cuantitativas en cuanto a las actividades relativas de algunas de ellas -así como de sus enzimas- individualmente consideradas.

Con respecto a la lipogénesis, se ha comprobado en pollo (Gibson y Nalbandov, 1966; Leveille y col., 1968) que el tejido adiposo es capaz de incorporar glucosa y acetato a ácidos grasos, pero en comparación con la rata dichos sustratos son utilizados más rápidamente en este mamífero (Leveille y col., 1968; Leveille, 1966). Además, la velocidad de incorporación de glucosa a ácidos grasos en el pollo es mucho mayor en hígado que en tejido adiposo (Leveille y col., 1968; Goodridge, 1968), calculándose por otra parte que el 95% de la síntesis de ácidos grasos en dicho animal acontece en el hígado (O'Hea y Leveille, 1969). En otras especies de aves también es este órgano el sitio preferencial de la lipogénesis (Goodridge y Ball, 1966; Goodridge y Ball, 1967; Evans, 1972).

A lo largo del desarrollo embrionario la lipogénesis es baja (Schoenheimer y Rittenberg, 1930; Kilsheimer y col., 1960), debido seguramente al elevado contenido en grasa de la yema de huevo. Tras la eclosión, la alimentación experimenta una elevación importante en su contenido glucídico -cereales de la dieta-, por lo que la ruta lipogénica del hígado se incrementa notablemente (Goodridge, 1968). En este sentido, se demuestra que las actividades de varias enzimas hepáticas implicadas en la conversión de glucosa a lípidos también aumentan fuertemente

durante el período postnatal. Sin embargo, las actividades de las mismas enzimas en tejido adiposo de varias especies de aves, permanecen bajas después del nacimiento hasta un mes de vida posnatal.

Todos estos estudios demuestran pues, que el hígado es el órgano lipogénico por excelencia, y además, los ácidos grasos en él sintetizados son transportados como triglicéridos en el plasma -formando parte de LDL-, para ser finalmente almacenados como reserva en el tejido adiposo.

El pollo representa por tanto, un modelo animal bastante distinto al normalmente utilizado en el laboratorio: el roedor, donde los ácidos grasos son almacenados en el mismo lugar de su síntesis (Favarger, 1965; Leveille, 1967). Esta circunstancia determina que pueda utilizarse un modelo no habitual para el estudio, tanto de la regulación de la lipogénesis en un órgano como la de su transporte. Además, las investigaciones sobre la lipogénesis hepática y su regulación en pollo tendrían un gran interés, pues contribuirían significativamente a la regulación del metabolismo lipídico humano, del que se conoce que el hígado es también el lugar principal de la síntesis de ácidos grasos (Galton, 1968; Shrago y col., 1971; Shrago y col., 1969).

La dieta de grasas y proteínas también influye sobre la síntesis hepática de lípidos, así como el ayuno durante cortos períodos de tiempo, el cual provoca una disminución de dicha capacidad lipogénica. En efecto, la retirada de la comida durante 2 horas determina un 90% de inhibición en la lipogénesis hepática, actividad que es restaurada por realimentación durante 1 hora o mediante administración intravenosa de glucosa o fructosa (Leveille, 1975). El mecanismo de regulación propuesto admitiría que la inhibición lipogénica observada en el ayuno o dieta grasa está precedida de un incremento en los niveles de ácidos grasos libres plasmáticos, que conduce a una inhibición

del transporte de citrato a través de la membrana, así como de la actividad acetil CoA carboxilasa, con lo que se inhibe la síntesis de ácidos grasos. Determinaciones paralelas de colesterogénesis demuestran la disminución total a los 3 días de ayuno y su normalización rápida por la realimentación.

Los pollos alimentados con una dieta de alto contenido en proteínas exhiben una menor relación lactato/piruvato, que es indicativo de una mayor oxidación citoplasmática. Dicho cambio del estado redox puede estar asociado al control de la lipogénesis.

Teekell y col. (1975) estudiaron el efecto del sexo, así como de la dieta de colesterol, estearato, oleato y/o linoleato, sobre la deposición de colesterol en sangre, hígado y aorta. Tras 5 meses de dieta se administró oralmente [1-<sup>14</sup>C]acetato y [1,2-<sup>3</sup>H]colesterol a fin de comprobar si el colesterol tisular es de origen endógeno o exógeno. Se observó que los machos presentan niveles de colesterol libre más altos que las hembras. Además, la suplementación de colesterol -2%- y ácidos grasos -6%- incrementó los niveles de colesterol libre en hígado y aorta. El colesterol almacenado en estos dos tejidos se encuentra en forma libre, mientras que en la sangre lo está en forma esterificada. Por otra parte, el colesterol de hígado y aorta es principalmente de origen endógeno.

En vista de que el sistema linfático del pollo está muy poco desarrollado, la gran cantidad de colesterol de la dieta es transportado bajo las dos formas, libre y esterificada. Sin embargo, las 3/4 partes del colesterol de aorta es de origen endógeno, lo que sugiere que la dieta de colesterol juega, con toda probabilidad, un papel bastante minoritario en el desarrollo de la arteriosclerosis en el pollo y que quizás el acetato o la energía metabólica podrían ser investigados como factores relacionados con esa enfermedad.

Con objeto de estudiar el efecto de los esteroides vegetales sobre los niveles de colesterol en plasma e hígado, Sklan y col. (1974) alimentaron pollos con una dieta de colesterol y aceite de soja, encontrando que los esteroides de dicho aceite producían una disminución en la concentración de colesterol. Asimismo, estudiaron la influencia de estos esteroides en la absorción y secreción de colesterol y ácidos biliares, comprobando que se reducía la absorción intestinal de dichos compuestos. También se comprobó el efecto de los esteroides vegetales sobre el contenido en colesterol de la yema de huevo, resultando una disminución significativa de éste, aunque no se afectan los tamaños del huevo y yema, ni el peso de la cáscara (Godfrey y col., 1976).

Hwang y col. (1975a) estudiaron el efecto de diversas sustancias hipocolesterolémicas -tales como colestiramina, esteroides vegetales y otros- sobre los niveles de colesterol y vitamina A de animales normales e hipercolesterolémicos alimentados con una dieta de vitamina A. Los resultados demuestran que dichas sustancias no sólo alteran los niveles de colesterol y ácidos biliares, sino también los de vitamina A. Dichos autores comprobaron el efecto de diferentes concentraciones de colestiramina y Sephadex, observando una potenciación del mismo a medida que aumentan estos valores (Hwang y col., 1975b).

Uno de los aspectos más interesantes del metabolismo del colesterol es la producción de hormonas esteroídicas sexuales y corticoadrenales. En embrión de pollo, los andrógenos se sintetizan 3 días antes de la diferenciación morfológica de las gónadas (Woods y Podczaski, 1974), lo que acontece a los 6 días y medio de la fecundación. Kalliecharan y Hall (1974) estudiaron los niveles plasmáticos de cuatro hormonas a lo largo del desarrollo embrionario del pollo: progesterona, corticosterona, cortisol y cortisona. Demostraron un continuo incremento de

dichos niveles durante la segunda mitad del desarrollo, para disminuir después de la eclosión. Ninguna de las hormonas predomina sobre las demás durante el período estudiado, considerándose que los cambios de concentración experimentados no sigue un modelo común. Estos mismos autores estudian los mismos niveles hormonales en las glándulas adrenales durante el desarrollo embrionario, observando un aumento de aquéllos hasta el decimoquinto día de incubación, seguido de un descenso hasta el decimonoveno para aumentar hasta la eclosión (Kalliecharan y Hall, 1976).

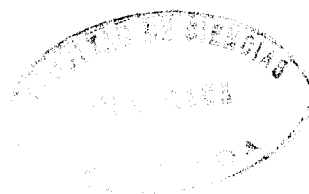
Boucek y Savard (1970) estudian la incorporación de acetato marcado en cortes de ovario de pollos hembras, detectándose la aparición de progesterona, androstendiona, testosterona y 17- $\beta$ -estradiol radiactivos, en cantidades diferentes según se encuentren en período de puesta o de muda. También se ha determinado la capacidad esteroidogénica de los ovarios en relación a la edad del animal, comprobándose que es mayor en animales de 1 día que en adultos (Galli y col., 1975). En comparación con la de testículos, éstos muestran una situación inversa ya que va en aumento con la edad del animal.

Se han estudiado varias de las enzimas que intervienen en la colesterogénesis en el pollo. Así, la HMG CoA sintetasa (Clinkenbeard y col., 1975a; Clinkenbeard y col., 1975b; Reed y col., 1975) en sus dos localizaciones, mitocondrial y citoplasmática, según la síntesis se dirija hacia cuerpos cetónicos o colesterol. También, la HMG CoA reductasa de gallinas ponedoras (Beg y col., 1977) y la prenil transferasa (King y Rilling, 1977). En hígado de pollo recién nacido, García-Martínez y col. (1976) llevaron a cabo un estudio de la mevalonato quinasa y fosfomevalonato quinasa durante los 10 primeros días de vida posnatal.

En este Departamento se ha caracterizado la enzima HMG

CoA reductasa de hígado e intestino de pollo, habiéndose comprobado además la influencia que la hora del día, algunas dietas y el desarrollo perinatal, ejercen sobre sus niveles de actividad (Marco y col., 1985; Ramírez y col., 1982; Marco y col., 1983; Marco y col., 1986a; Marco y col., 1986b). Asimismo, se ha estudiado la modulación de dicha actividad y de la composición lipídica microsomal, en función de la edad y la dieta de colesterol (Alejandre y col., 1981; Alejandre y col., 1985a; Alejandre y col., 1985b).

También se han realizado estudios acerca de la actividad PPMVA descarboxilasa, y más concretamente sobre la posible existencia de ritmo diurno, que aunque es un capítulo sujeto a controversia, se ha comprobado recientemente (González-Pacanowska y col., 1985a; González-Pacanowska y col., 1985b) la no existencia de cambios apreciables en dicha actividad hepática, renal e intestinal a lo largo del día. Además, se ha demostrado que la situación de ayuno determina un descenso de actividad en la enzima de origen hepático e intestinal, que vuelve a alcanzar sus niveles normales tras la realimentación. A lo largo del desarrollo embrionario se ha estudiado asimismo la evolución de estos niveles, encontrándose un aumento bastante acusado en cerebro entre los días 13 y 18 de incubación. Dado el paralelismo entre el perfil de actividad descarboxilasa cerebral y el contenido en colesterol libre de éste órgano, se ha sugerido un papel importante para esta enzima en la regulación de la colesterogénesis durante el proceso de mielinización. En cambio la actividad de hígado se mantuvo constante a lo largo de todo el desarrollo embrionario y con valores absolutos inferiores a los de cerebro. Respecto a la evolución de la actividad en el desarrollo posnatal del pollo, se observa que en intestino experimenta un ligero aumento hasta el octavo día para disminuir progresivamente hasta el decimotercero, último del período ensayado.





B. REGULACION HORMONAL DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL





Se han descrito un gran número de factores que tienen influencia en la biosíntesis de colesterol (Bortz, 1973; Bortz y col., 1973; Dugan y Porter, 1976), entre los que se encuentran algunas hormonas. Sería muy importante, desde un punto de vista terapéutico, demostrar la existencia de algún medio de regulación de la colesterogénesis que no estuviese implicado en el control "feedback", puesto que al ser éste un mecanismo autorregulador contribuye al mantenimiento de un nivel relativamente constante de colesterol. Sin embargo, podría acontecer una disminución importante de la tasa de colesterol si un agente -tal como una hormona- no actuase mediante aquella vía.

La demostración de que la enzima HMG CoA reductasa es el punto clave en la regulación del proceso de síntesis (Bucher y col., 1959; Siperstein y Fagan, 1966), posibilita que la mayor parte de los estudios recientes se lleven a cabo sobre dicha enzima, comprobándose por otra parte que cambios en la tasa de colesterogénesis conllevan otros paralelos en la actividad reductasa.

Ha sido ampliamente demostrado que bajo condiciones normales, tanto la actividad reductasa (Hamprecht y col., 1969; Kandutsch y Saucier, 1969; Shapiro y Rodwell, 1969) como la velocidad de colesterogénesis (Back y col., 1969) exhiben un ritmo en su evolución diurna, dependiente del período de ingesta más que del propio ciclo luz-oscuridad (Dugan y col., 1972; Booth y col., 1972; Gregory y col., 1972). Esta circunstancia sugiere, por tanto, que el factor regulador de dicha variación diurna en la actividad enzimática es de origen endógeno (Huber y col., 1973) y muy sensible además a alguna señal ambiental periódica. De hecho, es muy posible la existencia de un mecanismo regulador que implique una o varias hormonas, aunque Huber y col. (1973) demuestran que dicho ritmo diurno no está controlado por el contenido de serotonina o melatonina de la glándula pineal.

Los primeros estudios acerca del efecto hormonal sobre la síntesis de colesterol se llevaron a cabo a principio de la década de los 50. En aquel momento, la disponibilidad de  $^{14}\text{C}$  permitió el seguimiento de un compuesto a través de una ruta metabólica. La demostración de que el acetato actúa como fuente de todos los carbonos que componen la molécula de colesterol (Bloch y Rittenberg, 1942), así como que éste puede ser sintetizado en condiciones *in vivo* (Bloch y Rittenberg, 1942) o *in vitro*, constituyó el escenario para la determinación de los efectos hormonales sobre la conversión de [ $^{14}\text{C}$ ]acetato en colesterol. Las primeras experiencias se realizaron con animales completos, órganos perfundidos o cortes tisulares. También, Bucher (1953) demostró la incorporación de acetato marcado a colesterol por homogenados de hígado de rata, lo que determinó que muchos de los trabajos que se llevaron a cabo sobre regulación hormonal utilizaran dicha muestra biológica.

La determinación de un rápido método radiactivo de la actividad HMG CoA reductasa (Shapiro y col., 1969), así como la solubilización y purificación parcial de dicha enzima microsomal (Kawachi y Rudney, 1970; Heller y Gould, 1973, 1975; Brown y col., 1973; Ackerman y col., 1974), ha hecho de dicha medida la más empleada en los estudios con hormonas.

Por otra parte, los primeros estudios sobre carencia y suplementación de hormonas en la conversión de acetato a colesterol se realizaron entre los años 1950 a 1960, destacando el grupo de I.L. Chaikoff, que demostró el aumento e inhibición de la actividad HMG CoA reductasa por efecto de varias hormonas.

Estos y otros hallazgos anteriores a 1977 han sido recogidos en la revisión de Dugan y Porter sobre la regulación hormonal de la biosíntesis del colesterol (En "Biochemical Actions of Hormones" G. Litwack ed. vol.4 cap.4 Academic Press N.Y.).

En la década de los 80, los estudios sobre regulación hormonal de la colesterogénesis van encaminados a dilucidar el mecanismo de acción del efecto de estas hormonas sobre la HMG CoA reductasa.

B.1. HORMONAS TIROIDEAS. METABOLISMO Y ACCION

B.1.a. Origen y química

De la glándula tiroides se extrae una globulina iodada, la tiroglobulina, glucoproteína de peso molecular elevado que constituye el coloide de las vesículas tiroideas. A partir de ella, mediante hidrólisis, se extrajo el principio activo: la tiroxina, también conocida como tetraiodotironina o T<sub>4</sub> (Kendall, 1917).

Es la tiroxina un aminoácido aromático fenólico iodado (65% de iodo), que posee en su estructura dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno etéreo y una cadena lateral de alanina. Es ópticamente activo y el isómero L, forma natural, es más activo que el D (Boyd y Oliver, 1960; Greene y col., 1961). Sus características fisico-químicas más notables son:

Peso molecular: 776.9 (ácido libre)

798.9 (sal sódica)

888.9 (sal sódica pentahidratada)

Forma física: cristalizada, en forma de agujas blancas

Punto de fusión: 236°C

pK<sub>a</sub> (a 25°C): 2.20 (-COOH)

6.45 (-OH)

10.10 (-NH<sub>2</sub>)

Solubilidad: muy poco soluble en agua

soluble en álcali

insoluble en etanol y éter

Otras características: inestable a la luz, con pérdida de iodo. Durante la hidrólisis proteica, sobre todo con ácido, experimenta deiodinación. Forma

quelatos insolubles con  $Mg^{2+}$ ,  
 $Mn^{2+}$  y otros cationes divalentes

También existen en la glándula otros dos aminoácidos iodados derivados de la tirosina, que carecen de actividad biológica y se consideran precursores de la tiroxina: monoiodotirosina y diiodotirosina.

Se observó que la acción de la glándula tiroides desecada es mayor que la que corresponde a su contenido en tiroxina -única hormona tiroidea conocida hasta entonces-, por lo que se postuló la existencia de otra hormona, que fue aislada y sintetizada en 1953: la triiodotironina o  $T_3$  (Gross y Pitt-Rivers 1952, 1953a; Roche y col., 1952), de actividad generalmente mayor que la  $T_4$  (Gross y Pitt-Rivers, 1953b; Fields, 1957). También existe bajo las formas isómeras D y L, siendo esta última más activa. Sus características fisico-químicas más notables son:

Peso molecular: 651.0

Forma física: cristalizada

Punto de fusión: 233.4°C (se descompone)

$pK_a$  (a 25°C): 2.2 (-COOH)

8.4 (-OH)

10.1 (-NH<sub>2</sub>)

Solubilidad: muy poco soluble en agua

soluble en álcali

Otras características: inestable a la luz, con pérdida de iodo. Por calentamiento en ácidos fuertes -y álcalis, aunque en menor grado- experimenta deiodinación

Tanto la T<sub>3</sub> como la T<sub>4</sub> derivan de la tironina, que es de por sí inactiva, por lo que requiere la presencia de sustituyentes en su molécula para presentar acción hormonal:

\* la presencia de átomos de iodo en posiciones 3, 5, 3' y 5' (tres átomos en caso de la T<sub>3</sub> y cuatro en la T<sub>4</sub>)

\* el hidroxilo fenólico en posición 4' es necesario para una actividad hormonal normal; su eliminación o cambio de posición disminuye o suprime dicha actividad

\* el iodo en posición 3' es de capital importancia para una actividad tiroidea máxima; sin embargo, dicho átomo puede reemplazarse por un grupo metilo o etilo sin perder dicho efecto, aunque la potencia disminuye considerablemente

\* el puente de oxígeno es indispensable, pues su ruptura suprime totalmente la actividad tiroidea

\* la cadena lateral de alanina también es necesaria para una actividad tiroidea máxima, pues su modificación disminuye dicha actividad.

#### B.1.b. Biosíntesis

Los estudios realizados utilizando principalmente iodo radiactivo, han contribuido al esclarecimiento del mecanismo de síntesis y liberación de estas hormonas (Grollman, 1965; Keele y Neil, 1965; Klebanoff, 1965; Woeber, 1967), distinguiéndose en el proceso varias etapas:

A. Captación de yoduro por la glándula tiroides. La "trampa" de yoduro. El iodo ingerido con los alimentos pasa a la sangre como yoduro inorgánico (I<sup>-</sup>), siendo rápidamente capturado,

fijado y concentrado por la glándula. Esta "trampa" de ioduro tiene lugar en las células tiroideas hacia la luz folicular, estableciéndose el transporte de dicho ion en contra del gradiente de concentración entre el plasma y la glándula, lo que constituye un transporte activo o "bomba de ioduro", cuya energía necesaria es suministrada por el ATP. Dicha "bomba" es estimulada por la TSH, deprimida por la hipofisectomía y bloqueada por los tiocianatos.

B. Oxidación del ioduro a iodo e iodización. A fin de que el iodo pueda fijarse en las sustancias orgánicas, es necesario que el ion ioduro se transforme en iodo libre (elemental) dentro del folículo tiroideo, lo que acontece mediante la actuación de una enzima oxidante: la peroxidasa (De Robertis y Grasso, 1948). Esta etapa se encuentra inhibida por las tioureas.

Una vez formado, el iodo libre se une al aminoácido tirosina, que se encuentra integrado en la molécula de la tiroglobulina en el folículo, para formar primero monoiodotirosina (MIT) y después diiodotirosina (DIT).

C. Formación de las hormonas tiroideas.

Acoplamiento. La tiroxina o  $T_4$  se forma por acoplamiento de dos moléculas de diiodotirosina (DIT), con pérdida de un resto de alanina.

La triiodotironina o  $T_3$  se sintetiza en cantidad mucho menor que la anterior, por acoplamiento de una molécula de monoiodotirosina (MIT) y una de diiodotirosina (DIT), con pérdida de un resto de alanina.

En ambos casos interviene una enzima de acoplamiento, siendo dicho proceso bloqueado por las tioureas. Las hormonas tiroideas así formadas se encuentran en unión peptídica en la tiroglobulina (Mann y col., 1942; Morton y col., 1942; Reinecke, 1946; Klebanoff, 1965).



D. Liberación de las hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$ , así como la mono- y diiodotirosina, se encuentran unidas a la tiroglobulina en forma de la sustancia coloide de almacenamiento de los folículos tiroideos. Como la tiroglobulina no puede transitar -debido a su elevado peso molecular y tamaño- de la glándula a la sangre a través del epitelio folicular, lo que llega a la circulación son las hormonas  $T_3$  y  $T_4$ , una vez han sido liberadas de la tiroglobulina por una proteasa tiroidea (De Robertis y Nowinski, 1946). Esta es inhibida por el iodo, lo que disminuye la liberación de las hormonas tiroideas, mientras que la tirotrofina hipofisaria favorece dicha liberación (Morton y col., 1942).

La proteasa tiroidea también libera MIT y DIT de la tiroglobulina, pero estos compuestos pierden rápidamente el iodo por efecto de una enzima, la desiodinasa, y el ioduro formado se utiliza de nuevo para sintetizar hormonas tiroideas a partir de la tirosina liberada.

Las hormonas tiroideas, una vez liberadas, llegan a la sangre atravesando el epitelio tiroideo y circulan unidas a las proteínas plasmáticas, especialmente con una  $\alpha$ -globulina, la denominada TBG o globulina fijadora de tiroxina (Deiss y col., 1953). Dicha unión es más intensa para la  $T_4$  que para la  $T_3$ . La combinación hormonas tiroideas-TBG constituye el llamado iodo proteico o precipitable.

La  $T_4$  combinada a TBG se encuentra en equilibrio reversible con una pequeña cantidad de  $T_4$  libre, que es la que en realidad ejerce la acción hormonal al abandonar la circulación y pasar a los tejidos.

#### B.1.c. Absorción y distribución

Las hormonas tiroideas presentan su actividad total cuando se administran por vía bucal. Sin embargo, cuando se suministran en forma pura -especialmente la  $T_4$ - se absorben en

cantidad algo menor que cuando se administran en forma de tiroglobulina, pues en este caso aquéllas están protegidas por su combinación con las cadenas polipeptídicas de la proteína (Sollmann, 1957).

Las hormonas puras en forma de sales sódicas, se absorben completamente cuando se administran por vía subcutánea, pero ésta es poco utilizada porque las soluciones son demasiado alcalinas.

Una vez absorbidas, las hormonas tiroideas pasan a la sangre donde se combinan con las proteínas plasmáticas de forma reversible (Klebanoff, 1965; Ingbar y Woeber, 1967).

La  $T_4$  se combina con:

- \* TBG (globulina fijadora de  $T_4$ )
- \* TBPA (prealbúmina fijadora de  $T_4$ )
- \* Seroalbúmina

Por su parte, la  $T_3$  se enlaza menos firmemente a la TBG y no lo está en absoluto a la TBPA. Con la seroalbúmina se combina algo más. Por todo ello, abandona la circulación más fácilmente que la  $T_4$ , siendo su acción más rápida y potente.

Las hormonas tiroideas combinadas a las proteínas, se encuentran en equilibrio reversible con pequeñas cantidades de hormona libre, estado al cual es como llevan a cabo su acción fisiológica, distribuyéndose por todos los tejidos, especialmente corazón e hígado.

B.1.d. Destino y excreción

Las hormonas tiroideas son metabolizadas en el organismo en distintas formas (Klebanoff, 1965; Ingbar y Woeber, 1967).

La T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> se conjugan en el hígado con el ácido glucurónico -sobre todo la T<sub>4</sub>- y con el ácido sulfúrico -sobre todo la T<sub>3</sub>- a nivel del radical fenólico. Los conjugados se eliminan vía biliar, y al ingresar en el intestino experimentan una hidrólisis -por las bacterias intestinales- que determina la liberación de las hormonas, las cuales vuelven a reabsorberse mediante la circulación enterohepática y reingresan en el hígado.

En el hígado y riñón, las hormonas tiroideas experimentan una desaminación que origina derivados pirúvicos, los cuales -debido a su gran inestabilidad- se transforman mediante un proceso de reducción en derivados lácticos, y mediante otro de descarboxilación en derivados acéticos. Estos derivados son activos y se conjugan asimismo con los ácidos glucurónico y sulfúrico en la misma forma que la T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>.

A nivel de todos los tejidos -y especialmente en hígado y músculo-, las hormonas tiroideas y sus metabolitos pierden el iodo que se reduce a yoduro, el cual es eliminado parcialmente vía renal y el resto captado por la glándula tiroides.

B.1.e. Acción fisiológica

La acción fundamental de la tiroides y sus hormonas es la estimulación de la actividad metabólica global del organismo, lo que llevan a cabo a varios niveles:

A. Acción calorigénica. Las hormonas tiroideas estimulan el metabolismo, o sea la producción de calor, lo que se

denomina acción calorigénica.

Además aumentan el consumo de oxígeno y la eliminación de CO<sub>2</sub>, así como la excreción de nitrógeno.

B. Metabolismo de proteínas y glúcidos. Las hormonas aumentan la absorción intestinal de la glucosa y los procesos de glucogenolisis y gluconeogénesis.

C. Metabolismo de lípidos. Colesterolemia. Las hormonas tiroideas provocan generalmente un descenso de la colesterolemia.

Por otra parte, también actúan a nivel de:

D. Sistema cardiovascular. Determinan las hormonas un aumento de la actividad cardíaca (volumen sistólico y frecuencia).

E. Sistema nervioso central. En el hipotiroidismo existe un retardo del desarrollo del SNC, tanto a nivel somático como psíquico.

F. Diuresis. Las hormonas tiroideas producen un aumento de la diuresis debido a un aumento del flujo sanguíneo renal, filtración glomerular y excreción de K<sup>+</sup>.

G. Crecimiento y desarrollo. Sistema óseo. Las hormonas aceleran el desarrollo y el crecimiento, así como el normal proceso de osificación.

H. Sobre la hipófisis. La TSH desarrolla y mantiene el estado funcional de la glándula tiroides, estimula la captación de iodo por la misma, activa la conversión de DIT en T<sub>4</sub> y estimula la liberación de las hormonas tiroideas.

A su vez, el nivel plasmático de dichas hormonas

regula la secreción de TSH.

B.1.f. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas es un aspecto aún no resuelto del todo en la actualidad, respecto del cual existen algunas teorías:

\* La acción se llevaría a cabo a través de un proceso de oxidación-reducción, dado que el radical fenólico de la estructura de las hormonas es esencial para su actividad. Dicho grupo se oxidaría en el curso de la acción, convirtiéndose en un radical tipo quinona o semiquinona. Incluso se postula que éste radical oxidado sea la porción activa de la molécula.

\* Las hormonas ejercerían un efecto directo sobre las enzimas implicadas en los distintos procesos metabólicos que son sensibles a dicha acción hormonal. Esta teoría está basada en la medida de algunos niveles enzimáticos -fundamentalmente mitocondriales- que varían de forma significativa con la administración de la hormona (Tapley y Hatfield, 1962).

\* La existencia de interacción hormona-iones metálicos, argumento basado en la observación de complejos formados por la  $T_4$  con algunos iones metálicos, tales como  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , los cuales se encuentran formando parte de enzimas cuya actividad se afecta por la hormona (Tata y col., 1963).

\* Efecto directo sobre las membranas mitocondriales, teoría resultante de la observación de dicho efecto tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. En efecto, las mitocondrias aisladas de ratas tratadas con  $T_4$  son más frágiles que las controles y presentan un hinchamiento notable.

Asimismo se ha sugerido que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la alteración experimentada en la actividad de algunas enzimas mitocondriales -efectos inducidos por la tiroxina-, son consecuencia directa de la acción hormonal sobre la estructura mitocondrial.

\* Hay autores (Oppenheimer y col., 1972) partidarios de la existencia de un "mensajero de larga vida" que controle las manifestaciones tisulares del efecto de las hormonas tiroideas, teoría que concuerda con la observación de un "tiempo de latencia" o período que transcurre desde la administración de dichas hormonas hasta la manifestación de los primeros efectos.

Inicialmente se planteó el problema de si las hormonas tiroideas afectaban al organismo en su conjunto o únicamente a tejidos y órganos específicos (Barker, 1951). Más adelante se concibió la cuestión a nivel celular, subcelular y enzimático.

A nivel celular, el mecanismo que determina la entrada en la célula de las hormonas no está todavía completamente aclarado, si bien se cree que su unión a ciertas proteínas portadoras juega un papel importante en dicha acción, ya sea para orientar específicamente a dicha hormona a que atraviese la membrana desligada de la proteína -hipótesis más admitida y apoyada por las investigaciones de Sterling y col. (1961)-, o bien porque lo haga todo el complejo hormona-proteína.

Por otra parte, teniendo en cuenta que las hormonas tiroideas actúan a nivel de metabolismo basal y que es fundamentalmente en la mitocondria donde acontecen los procesos oxidativos celulares, es lógico pensar que la mayoría de los trabajos estén orientados hacia la investigación de los efectos hormonales sobre la estructura y función mitocondriales. En efecto, se demuestra una estrecha relación de causalidad, aunque todavía no esté muy claro si dicha acción directa es la primaria

y fundamental, dada su influencia notable sobre otras funciones celulares importantes como puede ser la síntesis proteica. A este respecto existe una controversia entre los partidarios de la acción a nivel de estructura mitocondrial (Sokoloff y Kaufman, 1959, 1961; Hoch y Lipmann, 1953) y los que consideran que el efecto se centra en una activación de la síntesis proteica (Tata y col., 1962; Tata, 1964). También se han observado importantes acciones de la  $T_3$  a nivel nuclear, como la estimulación de la actividad RNA polimerasa DNA-dependiente (Widnell y Tata, 1963), evento que acontece durante el "período de latencia" de dicha hormona. Sin embargo, no parece que la hormona actúe directamente sobre la enzima, ya que al incubar *in vitro* núcleos de células hepáticas en presencia de  $T_3$ , no se observó ningún efecto sobre dicha actividad. Por otra parte, Malamud y Perrin (1974) demuestran un efecto estimulador de la  $T_3$  sobre la síntesis de DNA nuclear. Todos estos resultados parecen sugerir que esta hormona desempeña alguna función importante en la etapa de transcripción (Siegel y Tobías, 1966; Tata, 1966; Samuels y Tsai, 1973; Surks y col., 1973).

## B.2. INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO

Se ha observado repetidamente el efecto opuesto que producen las hormonas tiroideas sobre el metabolismo, según se administre a bajas o altas dosis ("efecto bifásico"). Cuando se ensayan en pequeñas cantidades, provocan una acción fundamentalmente anabolizante, mientras que si la dosis es elevada, su fuerte efecto catabolizante llega a enmascarar el débil papel anabólico que pudiera existir.

La acción que las hormonas tiroideas ejercen sobre el metabolismo lipídico no está del todo claro, existiendo algunas contradicciones. En efecto, existen autores que atribuyen a la T<sub>3</sub> una influencia positiva en la lipólisis, ya que observan un aumento del nivel de ácidos grasos en sangre (Rich y col., 1959; Kaciuba-Uscilko y Brzezinska, 1973) como consecuencia de su administración.

Respecto a la colesterogénesis parece ser que estas hormonas aumentan tanto su síntesis como su degradación, resultando una hipocolesterolemia neta (Tata, 1964; Hoch, 1962). Algunos autores opinan que el efecto de las hormonas sobre el metabolismo lipídico es consecuencia directa de su efecto sobre el nivel de glucógeno y de ATP en hígado, ya que dichos efectos hormonales sobre la síntesis de colesterol y ácidos grasos se revierten al suplementarlos al medio (Fletcher y Myant, 1961). No obstante, también existen resultados que demuestran un descenso de la colesterogénesis en casos de hipertiroidismo (Handler, 1948; Scaife y Migicovsky, 1957; Wayne, 1960).



### B.3. INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA COLESTEROGENESIS

Ya en los años 50 se pudo comprobar la relación existente entre la actividad de la glándula tiroides y la colesterogénesis hepática, demostrándose que la velocidad de síntesis y "turnover" de colesterol descendían en ratas hipotiroideas (Byers y col., 1952; Marx y col., 1953; Dayton y col., 1954). Posteriormente, Fletcher y Myant (1958) demuestran que la tasa de síntesis de colesterol a partir de acetato en cortes de hígado disminuye un 80% tras la tiroidectomía, mientras que no varía cuando se utiliza mevalonato como precursor. El hecho de que la administración de hormonas tiroideas al animal sea capaz de restaurar la colesterogénesis hepática, y que la suplementación de dichos compuestos a un medio de incubación no presente dicha capacidad, sugiere un efecto metabólico distinto al de la acción hormonal directa sobre las enzimas de la ruta biosintética.

Más recientemente, Guder y col. (1968) demostraron que la actividad HMG CoA reductasa está disminuída en cerca de un 50% en ratas hipotiroideas con respecto a las normales. Por tanto, parece que el punto donde la ruta biosintética entre acetato y colesterol se encuentra afectada, se localiza a nivel de una enzima que por dicha causa se constituye en factor de regulación de la ruta.

Por otra parte, se demuestra que los niveles de colesterol sérico se encuentran elevados en el estado hipotiroideo y disminuídos en la condición hipertiroidea (Pitt-Rivers y Tata, 1959). También hay resultados que demuestran la existencia de una relación inversa entre niveles de colesterol en plasma y función tiroidea (Chaikoff y col., 1941), así como entre velocidad de incorporación de acetato a esteroides y estado tiroideo (Karp y Stetten, 1949; Rosenman y col., 1952a; Byers y

col., 1952; Gould, 1959). Estas relaciones inversas han sido atribuidas a la alteración de la tasa de degradación y eliminación del colesterol, lo que acontece al mismo tiempo que la variación de su velocidad de síntesis. La combinación de estos hechos determina un alejamiento de la tasa de recambio del colesterol de sus valores normales (Rosenman y col., 1952b). También estos mismos autores demuestran que las ratas hipertiroideas metabolizan el colesterol inyectado intravenosamente a mayor velocidad que las normales e hipotiroideas. La recopilación de todos estos hallazgos condujo a Kritchevsky (1960) a la conclusión de que el aumento de la tasa catabólica del colesterol en el estado hipocolesterolémico está originado por sustancias tiroideas activas.

Retornando al capítulo de acción tiroidea sobre la colesterogénesis, ya se ha dicho que existen bastantes evidencias que sugieren un control a nivel de la HMG CoA reductasa (Gries y col., 1962,1963), cuyo patrón de respuesta a las hormonas tiroideas es similar tanto en animales hipotiroideos como en los hipofisectomizados, comprobándose la existencia de un "tiempo de latencia" de algo más de 24 horas a partir de la administración hormonal, y un máximo de actividad reductasa que se localiza a las 48 horas de aquélla. Dichos autores sugieren que durante el período de latencia la hormona estimula la síntesis de enzima a través del aumento de producción de RNA nuclear. Resultados similares fueron encontrados por Ness y col. (1973) sobre estimulación de dicha enzima por tratamiento con  $T_3$  en ratas hipofisectomizadas. Asimismo demuestran que la presencia de actinomicina D conlleva un bloqueo de dicha estimulación, lo que indica una actuación hormonal directa a nivel de síntesis del RNAm que codifica la proteína enzimática.

Tsung-Chin y Shih-Chen (1965) han demostrado que la  $T_4$  estimula la incorporación de acetato a colesterol, pero no en todos los órganos, siendo en glándula adrenal e hígado donde se

registran los mayores niveles de aumento. También se ha comprobado -en condiciones *in vitro*- que análogos de hormonas tiroideas inhiben la colesterogénesis a partir de acetato pero no de mevalonato (Fletcher y Myant, 1960; Eskelson y col., 1970). Por tanto, parece ser que las hormonas tiroideas -estimuladoras a concentraciones bajas de la síntesis *de novo* de HMG CoA reductasa- inhiben esta actividad catalítica a concentraciones elevadas mediante su unión con la enzima. Se trataría de un caso de modulación enzimática dependiente de la concentración del efector: para valores bajos de éste (hormona) se encuentra favorecida la síntesis de la enzima, mientras que ésto no ocurriría -incluso se registra un leve descenso- a concentraciones más altas.

La administración de tiroxina incrementa la conversión del mevalonato a colesterol en riñón de rata (41% en hembras y 22% en machos (Feingold y col., 1980). La inducción de hipotiroidismo en ratas por 6-n-propil-2-tiouracilo redujo la conversión renal de mevalonato circulante a colesterol en un 45% en hembras y un 27% en machos (Feingold y col., 1980). La administración de hormona tiroidea retornó la colesterogénesis en los riñones a valores normales. Ni la tiroxina ni el hipotiroidismo alteraron la conversión de mevalonato a colesterol en hígado (Feingold y col., 1980). Cambios en la hormona tiroidea sólo producen pequeñas alteraciones en el "shunt" del mevalonato en rata (Feingold y col., 1980).

Ratas hipercolesterolémicas han sido un modelo idóneo para investigar varios aspectos de la alteración del metabolismo de lipoproteínas (Krul y Dolphin, 1982). La rata y el perro son especies particularmente resistentes a desarrollar hipercolesterolemia y requieren la inducción simultánea de un estado hipotiroideo. Así, el fármaco antitiroideo propiltiouracilo se añade generalmente a la dieta alta en grasa o colesterol, usada para inducir la hipercolesterolemia en estos

animales. La acumulación de  $\beta$ -VLDL anormales con alto contenido en colesterol y apolipoproteína E en el suero de ratas hipercolesterolémicas parece ser debido, en parte, a la síntesis y secreción de estas partículas por el hígado (Dolphin, 1981). Hay estudios que indican que las hormonas tiroideas pueden tener un papel directo en la regulación del metabolismo de lipoproteínas (Keyes y col., 1981; Krul y Dolphin, 1982).

A pesar de que la síntesis endógena de colesterol está aumentada en los pacientes hipertiroideos (Nagaoka y col., 1986), éstos presentan por el contrario una concentración menor de colesterol total y colesterol de LDL en suero porque incrementa el catabolismo de dicha lipoproteína, la excreción de colesterol por bilis y presentan una circulación enterohepática reducida (Müller y Seitz, 1984). En individuos hipotiroideos hay una reducción de la síntesis de colesterol y del catabolismo de LDL, mientras que la reabsorción de colesterol no cambia o incluso aumenta (Müller y Seitz, 1984). Además pacientes hipotiroideos obesos muestran un aumento de la síntesis de colesterol.

Se han utilizado cultivos de fibroblastos humanos en numerosas ocasiones para estudiar la regulación del metabolismo de lípidos y lipoproteínas, y han sido especialmente útiles para establecer la ruta del receptor de LDL y las anormalidades en la familia hipercolesterolémica (Brown y col., 1973; Goldstein y Brown, 1983). Sin embargo, se está reconociendo la necesidad de definir bien un medio de cultivo artificial para las células (Barnes y Sato, 1980; Ham y McKeenham, 1978), ya que la preparación de los sueros deficientes de lípidos o lipoproteínas usados en la preincubación de las células para inducir los receptores y la síntesis de lípidos antes del ensayo, puede introducir artefactos. La presencia en el suero de hormonas y factores de crecimiento en concentraciones variables también complica el estudio de sus efectos en el metabolismo lipídico. Así, se han encontrado estímulos en la incorporación de acetato a

colesterol no coordinados con un incremento en la actividad HMG CoA reductasa (Amorosa y col., 1984). El bloqueo de la coordinación en la respuesta entre estos dos parámetros en células preincubadas en medio artificial, no se pudo explicar por:

a) estimulación de un paso posterior al mevalonato medido por incorporación de mevalonato a colesterol

b) inactivación *in vitro* de la HMG CoA reductasa por fosforilación :la incubación de microsomas de fibroblastos con fosfatasa alcalina de E. coli resultó en una reducción de actividad HMG CoA reductasa, en contraste con un incremento en los microsomas hepáticos

c) la presencia de inhibidores de HMG CoA reductasa en los extractos microsomales.

Estos resultados indican que la actividad HMG CoA reductasa no puede ser considerada como el único índice de la síntesis de colesterol, sobre todo en cultivo de células, bajo todas las condiciones experimentales estudiadas. Sin embargo, como ya se ha dicho en apartados anteriores esta enzima cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol y juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de éste (Spady y col., 1985). La actividad reductasa presenta rápidos y grandes cambios en respuesta a las necesidades corporales de colesterol, sus productos y otros metabolitos derivados del mevalonato. Estos cambios son efectuados por dos señales: dieta y hormonas. Quizás el proceso regulador mejor estudiado sea el sistema "feedback" mediado por LDL, y se ha demostrado que la reducción de actividad HMG CoA reductasa por dicha lipoproteína es debida a la suspensión de la etapa de transcripción del gen de la reductasa y aceleración en la degradación de la proteína reductasa (Faust y col., 1982; Edwards y col., 1983; Luskey y col., 1983; Gil y col., 1985; Chin y col., 1985). Sin embargo, y en contraste con la regulación por LDL, no se sabe casi nada sobre los mecanismos por los que varias hormonas regulan la

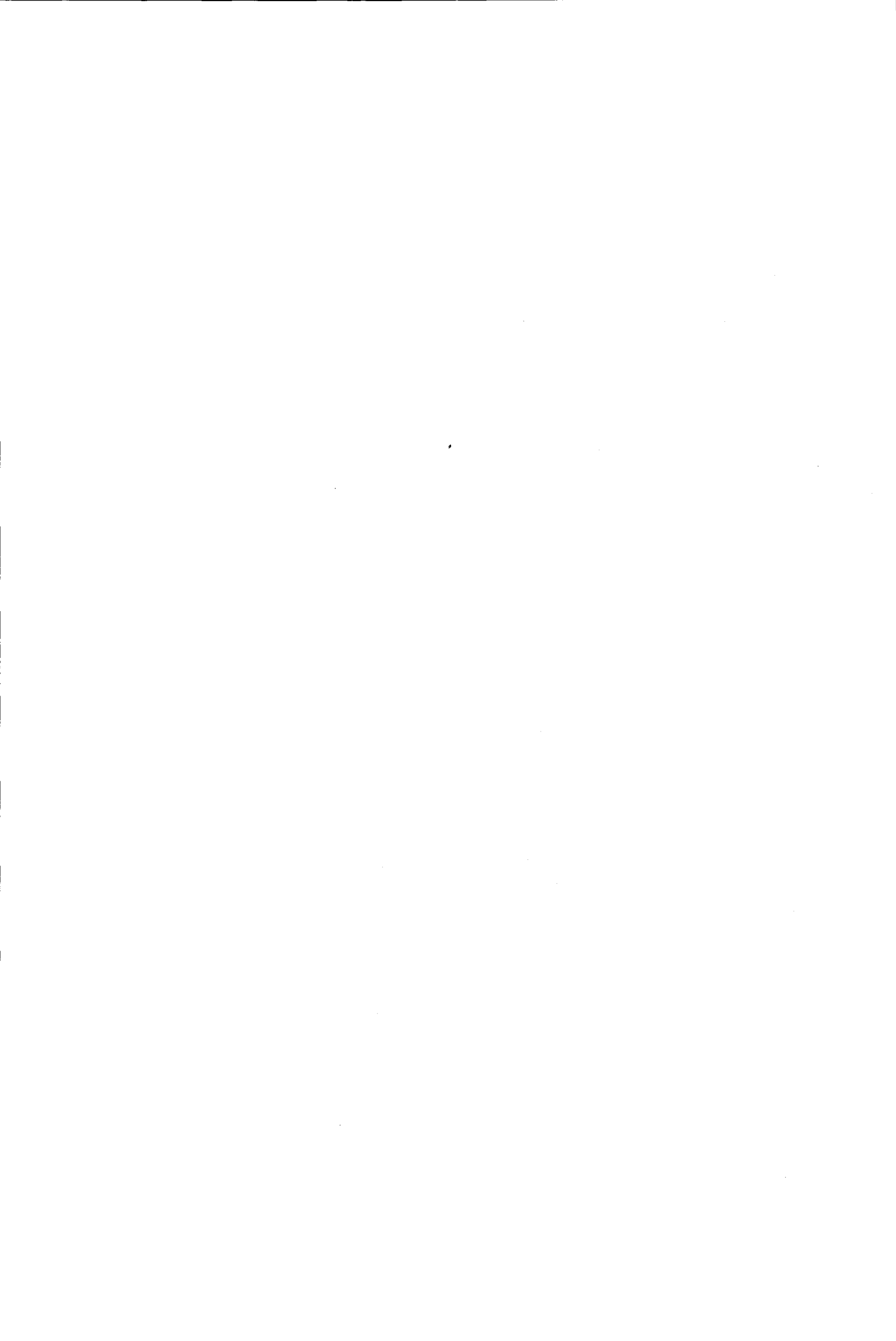
actividad HMG CoA reductasa. Con respecto a las hormonas pituitarias, se ha demostrado que la actividad reductasa hepática se reduce a niveles muy bajos en ratas hipofisectomizadas (Ness y col., 1973). La administración de  $T_3$  a estos animales, incrementa la actividad reductasa alrededor de 3 veces por encima del valor normal. La actinomicina D y la cicloheximida bloquean el incremento de la actividad reductasa mediado por la  $T_3$ . Esto sugiere que el efecto de la  $T_3$  se debe a un incremento en la síntesis de RNA y de proteínas. En efecto, la administración de triiodotironina resulta en un gran incremento en actividad HMG CoA reductasa, síntesis de proteínas y de ARNm.





III. PLAN DE TRABAJO





Considerando los antecedentes bibliográficos expuestos en la sección correspondiente de la presente Memoria, se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo.

UNO.

Establecimiento de las condiciones óptimas para el estudio de la colesterogénesis *in vivo* en hígado, mucosa duodenal, riñón y cerebro de pollo, utilizando [1-<sup>14</sup>C]acetato como precursor. Asimismo, se evalúa la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración a partir de dicho sustrato, como un índice de su degradación oxidativa destinada a la obtención de energía.

DOS.

Estudio de la evolución diurna en condiciones *in vivo* tanto de los niveles de colesterogénesis en dichos tejidos, como de la producción de CO<sub>2</sub>, ambos a partir de acetato.

TRES.

Estudio comparativo de la contribución de diversos tejidos a la actividad colesterogénica *in vivo* a partir de acetato.

CUATRO.

Determinación de las condiciones idóneas para la evaluación *in vitro* de la capacidad colesterogénica y oxidativa de algunos tejidos a partir de acetato, en comparación con las establecidas en condiciones *in vivo*.

CINCO.

Estudio comparativo de la influencia de los tratamientos con hormonas tiroideas -T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>- y PTU, sobre la actividad colesterogénica de hígado y riñón en condiciones *in vivo* e *in vitro*, utilizando acetato y mevalonato como precursores. Asimismo, se evalúa el efecto sobre algunos enzimas que constituyen importantes puntos de control de dicha ruta biosintética.

#### IV. MATERIAL Y METODOS



A. MATERIAL



## A.1. ANIMALES

Los estudios que constituyen la presente Memoria se llevaron a cabo en ejemplares machos pertenecientes a la especie *Gallus domesticus* -variedad Leghorn Blanca-, de edades comprendidas entre 11 y 60 días de vida posnatal.

El sexo de dichos animales fue determinado inmediatamente después de la eclosión, por personal especializado de la empresa comercial Avigrana S.A., quien los suministró generosamente.

### A.1.a. Condiciones de mantenimiento

Una vez seleccionados, los animales fueron trasladados a una espaciosa cámara de cría, dotada de unas excelentes condiciones de aislamiento térmico, acústico y lumínico respecto del exterior de la misma. En su interior, se disponen dos baterías de jaulas -de varios pisos cada una- provistas de bebederos con aporte automático de agua, así como de amplios comederos que permiten un muy fácil acceso al alimento. Dicha estancia -y con el fin de mantener una periódica renovación de su atmósfera interior- está dotada de un sistema extractor de turbina con un ciclo automático de conexión/desconexión, cuya alternancia es de unos 10 minutos aproximadamente.

La temperatura se mantuvo prácticamente invariable, alcanzando un valor medio de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , suficiente para las necesidades calóricas de estos animales, sobre todo en su período de vida posnatal.

Por otra parte, la cámara está provista de un sistema de iluminación artificial constituido por varios conjuntos de tubos fluorescentes adosados a las paredes y distribuidos de tal



manera, que suministren la luminosidad necesaria para una perfecta visualización por los animales tanto del alimento como de su entorno ambiental, y dentro de éste, sobre todo, de sus propios congéneres.

Con el fin de habituarlos desde su nacimiento al ciclo diario natural luz-oscuridad, se estableció una alternancia de etapas de iluminación y oscuridad, cuya periodicidad se fijó en 12 horas y se mantuvo prácticamente constante mediante un temporizador electrónico. Con objeto de acomodarlo al horario natural -y por tanto, de trabajo-, dicho ciclo artificial se ajustó aproximadamente a aquél, corrigiéndose a lo largo del año según la hora oficial.

Los animales presentaron en todo momento libre acceso a la bebida y comida, estando constituida ésta por una dieta estándar especial para "pollitos arranque" -denominación comercial Sanders A-00-, cuya composición porcentual en peso es:

Cereales	63
Harinas de oleaginosas	27
Harinas proteicas de pescado	4
Compuestos minerales	2.7
Alfalfa deshidratada	2
Corrector vitamínico	1
Sal	0.3
	<hr/>
Total	100.0

## A.2. INSTRUMENTACION

Las distintas pesadas efectuadas (animales, órganos, preparaciones tisulares, reactivos, etc.), se llevaron a cabo generalmente en una balanza monoplato marca Sartorius (Göttingen, FRG), con capacidad de hasta  $160.0 \pm 0.1$  g. Para las determinaciones de mayor precisión, se utilizó otra balanza de la firma Mettler modelo H20T (pesada máxima  $160$  g  $\pm 0.01$  mg).

En las medidas de pH se utilizó un medidor Radiometer modelo PHM 84 (Copenhague, Denmark), con una precisión de hasta  $\pm 0.001$  unidad de pH.

En la obtención de cortes finos de los distintos tejidos estudiados, se utilizó un microtomo manual C.A. Thomas Co. (Philadelphia, USA), provisto de cuchillas de acero nº7 120D.

Las incubaciones de las muestras tisulares, así como las reincubaciones correspondientes para la recogida del  $^{14}\text{CO}_2$  liberado durante las experiencias *in vitro*, se realizaron en matraces de capacidad reducida con pocillo central, dispuestos en incubadores metabólicos Gallenkamp modelo IH-350, dotados de un sistema de agitación con regulación de velocidad.

La disposición de las alícuotas de insaponificables totales en las placas cromatográficas, se efectuó mediante micropipetas de enrase automático por estrangulamiento "Emil Works". En los demás casos que requerían medidas de pequeños volúmenes, se utilizaron otras de la firma "Finnpipette" (Finland).

En las experiencias llevadas a cabo en condiciones *in vivo*, los animales se colocaron en el interior de unos recipientes de vidrio adecuados, tal como se describe más adelante en la sección "Métodos".

Los lípidos insaponificables de los distintos tejidos, disueltos en éter de petróleo, fueron desecados en un rotavapor de la firma Buchi modelo "R".

Para la cromatografía en capa fina, se utilizó un dispositivo extensor de silicagel en placa, graduado para un espesor de 0.5 mm, de la marca Quickfit modelo 8 CR.

La destilación del agua se realizó en equipos Vitrolab tipo VI-5001 y Pobel modelo 703.

Para obtener mezclas y disoluciones homogéneas, se utilizaron procedimientos mecánicos: vibradores Whirlimixer y Heidolph así como agitadores s/Invester.

Por otra parte, la medida de la radiactividad de las muestras de  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  se llevó a cabo en contadores de centelleo líquido Phillips tipo PW-4510 y Beckman modelo LS-7500. Asimismo, las muestras que contienen  $^{125}\text{I}$ , y fueron utilizadas en la evaluación cuantitativa de los niveles de  $\text{T}_3$  y  $\text{T}_4$ , se midieron en un contador Behring tipo Gamma Counter 1612.

El proceso de los datos experimentales obtenidos, se realizó en computadoras programables Olivetti modelo P-101, EAKA tipo EG-3003 (Video Genie System) y Compucorp 445 Statiscian.

### A.3. REACTIVOS

La totalidad de los productos radiactivos empleados -y que se relacionan a continuación-, fueron suministrados por la firma Amersham International (Amersham, UK):

\* [1-<sup>14</sup>C]Acetato sódico y (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonolactona, como precursores de la ruta metabólica considerada

\* [3-<sup>14</sup>C]HMG-CoA, como sustrato de la reacción enzimática catalizada por la HMG-CoA reductasa

\* [1-<sup>14</sup>C]mevalonolactona, como sustrato de la actividad PPMVA descarboxilasa

\* [7(n)-<sup>3</sup>H]colesterol y [2-<sup>14</sup>C]mevalonolactona, como estándares internos que permitan evaluar el rendimiento de los procesos de obtención de lípidos insaponificables y MVA (ambos, productos finales de etapa)

\* Na<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>H, como estándar externo que posibilite cuantificar la recuperación del CO<sub>2</sub> desprendido en las incubaciones *in vitro*.

Los reactivos utilizados en la preparación del medio de incubación, de los sustratos no marcados y de los distintos líquidos de centelleo, así como el silicagel de las placas cromatográficas, son de grado analítico y proceden de la firma comercial E. Merck (Darmstadt, FRG).

Los compuestos que constituyen los tratamientos administrados -en los estudios sobre la función tiroidea-, proceden de la empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), y son :

\* L-Tiroxina (L-T<sub>4</sub>), al estado de sal sódica pentahidrata-

da

\* 3,5,3'-triiodo-L-tironina (L-T<sub>3</sub>), bajo la forma de sal sódica

\* 6-n-Propil-2-tiouracilo (PTU).

Asimismo, son también de dicha firma los patrones empleados en las cromatografías.

La determinación de los niveles de hormonas tiroideas se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida, utilizando kits Coat-A-Count -para T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> totales-, de la firma Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, USA).

El resto de los productos empleados provenían de las casas Panreac (Barcelona, España) y C.Erba (Milano, Italia).

Por otra parte, los gases que se utilizaron son de gran pureza, siendo suministrados por Oximesa S.A. (Granada, España).

**B. METODOS**



B.1. ESTUDIOS *IN VIVO*

B.1.a. Metabolismo del acetato y MVA : incorporación a lípidos insaponificables y producción de CO<sub>2</sub>

B.1.a.1. Preparación de los sustratos radiactivos y del estándar interno

Como sustrato de la ruta metabólica objeto de dichos estudios se utilizó [1-<sup>14</sup>C]acetato -al estado de sal sódica-, con una radiactividad específica de 50 µCi/µmol. Una vez abierto el vial, se disolvió su contenido en el volumen adecuado de agua destilada estéril para que resulte una solución de 50 µCi/ml (1 mM). Así preparada, se mantuvo a una temperatura de +2°C.

En la mayor parte de los experimentos efectuados -salvo cualquier otra indicación expresa-, se empleó una concentración 8 mM y 20 µCi/ml (lo que representa una radiactividad específica de 2.5 µCi/µmol), para cuya preparación a partir de la solución original, fue preciso adicionar una cantidad adecuada de acetato sódico no marcado.

También se estudió *in vivo* el metabolismo del MVA, utilizando para ello (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonolactona con una radiactividad específica inicial de 18 µCi/µmol. Para su preparación, se disolvió el contenido del vial -junto con la cantidad adecuada de mevalonolactona no marcada- en un volumen apropiado de una solución de KOH en exceso (respecto de los equivalentes de ácido presentes), durante 30 minutos y a 37°C. La correspondiente sal potásica del MVA, así obtenida, fue 1.33 mM y 4 µCi/ml -lo que proporciona una actividad específica de 3 µCi/µmol-, y se conservó en el congelador a -20°C hasta el momento de su utilización.



Por otra parte, y como estándar interno para evaluar el rendimiento de la etapa de extracción de los lípidos insaponificables correspondientes, se empleó una disolución toluénica de [7(n)-<sup>3</sup>H]colesterol que contiene 10 µCi/ml aproximadamente. Se conserva en congelador para evitar variaciones de concentración por evaporación.

#### B.1.a.2. Administración de los sustratos

Los experimentos se iniciaban generalmente -salvo otra indicación-, momentos antes del comienzo de la fase luminosa, al objeto de que los animales no hubiesen ingerido alimento alguno (el pollo no come durante el período de oscuridad). El inicio de dicha etapa lumínica fue prefijada para las 9.00 a.m., siendo su amplitud de 12 horas.

En su caso, se inyectó intraperitonealmente a los pollos -que contaban, por lo general, con 15 días de edad- un volumen de 0.5 ml de la solución de acetato 8 mM ya descrita en el apartado anterior. Asimismo, cuando se utilizó MVA como precursor, se utilizaron animales de 10 a 12 días de edad a los que se inyectó 0.3 ml de la disolución de MVA 1.33 mM preparada como también se indicó en el mismo apartado.

Se emplearon en todos los casos jeringas desechables de polietileno de 1 ml de capacidad, habiéndose procedido previamente a la desinfección local de la zona abdominal elegida para dicha inyección. Asimismo -y para verificar la eficacia de la misma-, se administró a pollos de igual edad y de modo semejante, un volumen idéntico de una solución de Azul Tripán, constatándose -tras practicar una disección exploratoria de dicho área abdominal- un reparto bastante uniforme de este colorante por toda la superficie peritoneal, a los 5 - 10 minutos de la inyección.

Por otra parte, se ha optado por la vía intraperitoneal, en primer lugar ante la dificultad existente para llevar a cabo una punción a nivel de vaso sanguíneo -sea venosa o arterial-, ya que a la edad considerada la pared vascular es delgada y frágil ; y además porque representa un acceso lo suficientemente rápido y directo de los sustratos al medio interno del animal, circunstancia de enorme interés habida cuenta que el metabolismo de dichos sustratos se evalúa en condiciones *in vivo*.

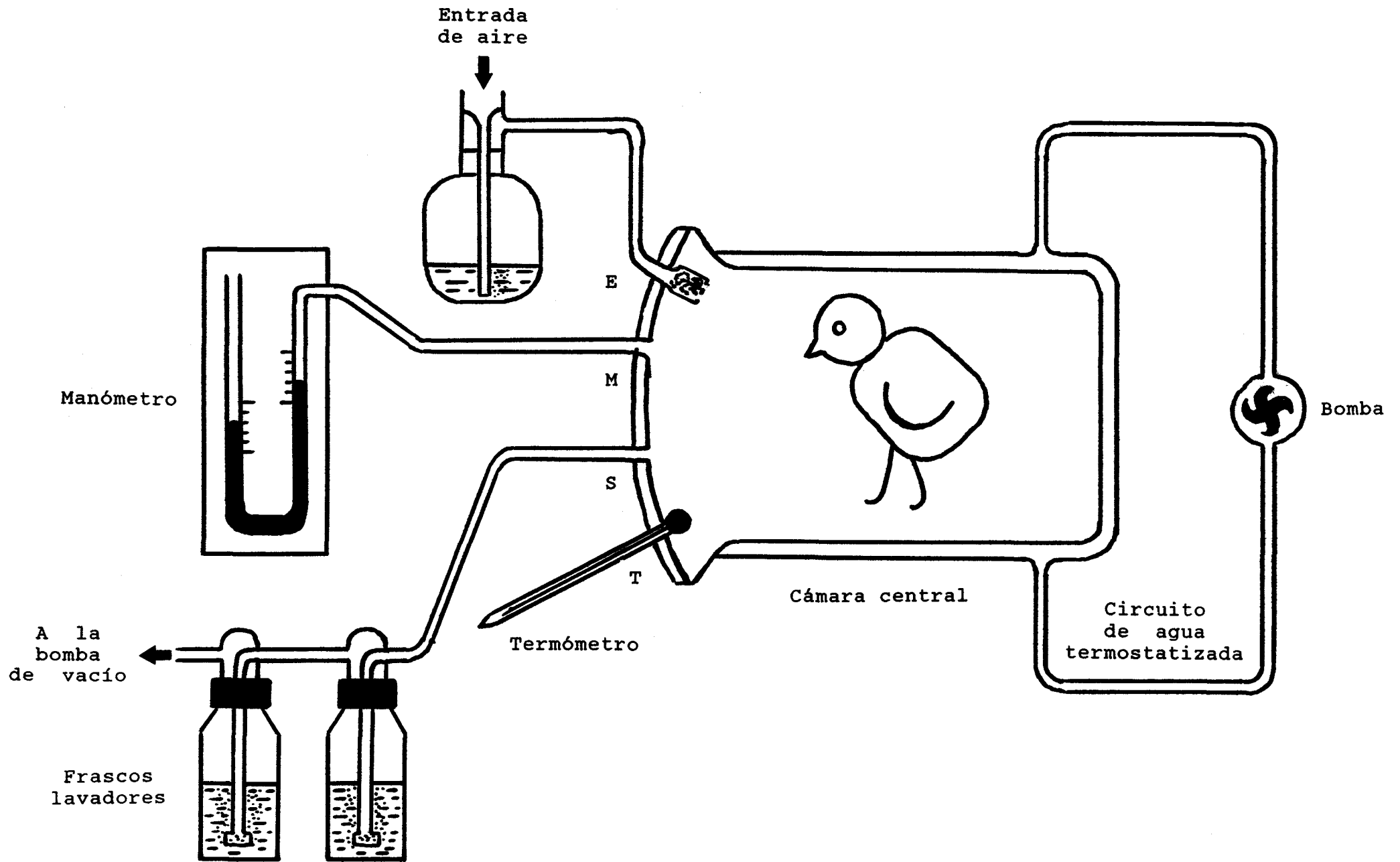
#### B.1.a.3. Descripción de la "unidad metabólica"

Con objeto de poder cuantificar lo más fielmente posible el CO<sub>2</sub> espirado por el animal -resultante de la oxidación de los sustratos administrados-, se diseñó un habitáculo provisto de una serie de accesorios, que resultase adecuado para la permanencia de aquél en su interior a lo largo del experimento. El conjunto constituye lo que se ha denominado "unidad metabólica", describiéndose detalladamente a continuación (Esquema nº7).

El cuerpo central -habitáculo- es un recipiente de vidrio con forma cilíndrica y provisto de dobles paredes, entre las que circula constantemente una corriente ("camisa") de agua que mantiene en su interior una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ideal para estos animales. Dicho habitáculo presenta una boca ancha de bordes esmerilados, que se cierra mediante una tapadera también de vidrio y provista de cuatro aberturas, correspondientes a:

(E) Entrada de aire. La entrada de aire al interior del habitáculo es posible gracias a la existencia de una cierta presión negativa en su interior, provocada por el efecto constante de succión de una bomba de vacío.

La corriente de aire así establecida -y antes de penetrar en dicho habitáculo-, se hace burbujear a través de una solución de NaOH 1N -para reducir a la mínima expresión su contenido en CO<sub>2</sub>- y posteriormente se hace pasar por cloruro cálcico escorifor



ESQUEMA 7

me a fin de eliminar, en lo posible, el exceso de humedad que pudiese contener. Dicho aire, pues, con estas características, va a constituir la atmósfera interior respirable de la cámara donde se sitúa el animal.

(T) Adaptación para termómetro. Un dispositivo termómetro con adaptador esmerilado, permite controlar la temperatura interior de la cámara que se situó en torno a los 28°C.

(M) Adaptación para manómetro. Mediante un manómetro se comprobó constantemente el descenso de presión en el interior, no sobrepasándose en ningún momento los 2 mm de mercurio respecto de la existente fuera de la cámara.

(S) Salida de aire y captura de CO<sub>2</sub> espirado. El efecto de vacío provocado por la bomba de succión, permite no solamente el ingreso de aire procedente del exterior, sino también su salida del habitáculo conteniendo los productos de la respiración del animal. Entre éstos, se encuentra el CO<sub>2</sub> resultante del metabolismo oxidativo de los sustratos utilizados, disponiéndose para su recogida dos frascos burbujeadores conectados en serie y que contienen NaOH 3N.

#### B.1.a.4. Recogida y medida del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> espirado

El animal -una vez inyectado- se introdujo rápidamente en la cámara, cerrándose su entrada a continuación. Conectado el mecanismo de bombeo, se establece el flujo de aire ya comentado. El CO<sub>2</sub> espirado por el animal -parte del cual es radiactivo-, se hace pasar a través de la solución de NaOH 3N contenida en dos frascos con 200 ml cada uno, permaneciendo de esta manera disuelto al estado de sal sódica (carbonato y/o bicarbonato). La radiactividad acumulada durante el tiempo del experimento -que, salvo indicación expresa, fue de 30 minutos en caso del acetato y de 90 minutos para el MVA- se evaluó a partir de la existente en cuatro

muestras alícuotas:

\* Experimentos con acetato

- Dos -0.1 y 0.2 ml-, extraídas del primer frasco
- Dos -0.25 y 0.5 ml-, del segundo frasco

\* Experimentos con MVA

- Las cuatro de 0.6 ml, procedentes dos de cada frasco

Dichos volúmenes se depositaron en viales de medida con 2 ml de etanol absoluto, agitándose brevemente hasta su disolución. Posteriormente se adicionaron 8 ml de líquido de centelleo, constituido por:

PPO	2 g
Dimetil POPOP	0.02 g
Tolueno	500 ml
Etanol	300 ml

Los viales así preparados, fueron agitados mecánicamente hasta conseguir una perfecta homogeneidad, midiéndose su radiactividad en un contador de centelleo líquido que utiliza un programa para  $^{14}\text{C}$  elaborado tras la determinación de la correspondiente gráfica de calibrado. Para la preparación de ésta, se utilizaron soluciones de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $\text{NaOH}$  3N como agentes productores de extinción ("quenching").

B.1.a.5. Extracción de los lípidos insaponificables totales.  
Medida de su radiactividad

Transcurrido el tiempo adecuado, los animales fueron sacados de las cámaras y rápidamente sacrificados por decapitación.

Una vez extraídos, los distintos órganos se lavaron con solución salina fría, eliminando cuidadosamente los restos de sangre, adherencias de grasa, etc. A continuación fueron troceados y se dispusieron en matraces Erlenmeyer que contenían KOH 90% -en proporción de 2 ml por g de órgano- y etanol 70% -en proporción 5:1 vol/vol respecto de la KOH utilizada-, procediéndose a su saponificación en caliente (sobre una superficie de 60°C) durante toda la noche, además de una completa hidrólisis y homogenización del tejido. Previamente a la saponificación, se añadió un estándar interno de [7(n)-<sup>3</sup>H]colesterol -preparado como se describe en el apartado B.1.a.1.- que contenía una cantidad de c.p.m. (cuentas por minuto) entre 6 y 10 veces superior a las correspondientes de <sup>14</sup>C en los lípidos insaponificables.

Al término de la saponificación, se procedió a la separación o extracción de los lípidos insaponificables del hidrolizado del tejido según se describe a continuación.

Dicho hidrolizado se pasa del matraz a un embudo de decantación, lavándose dicho Erlenmeyer con 40 ml de éter de petróleo (40-60°), que se añaden al embudo. Tras una agitación vigorosa y posterior decantación se obtuvieron dos fases, de las que se separa la superior u orgánica que contiene disueltos los lípidos insaponificables debido a su naturaleza fuertemente apolar. La inferior -acuosa- se somete a otros dos lavados similares con el mismo volumen de éter, recogiendo ambas fases orgánicas que se reúnen con la obtenida en la primera extracción. Las fases acuosas se desechan. En dicha fase orgánica conjunta se llevaron a cabo dos lavados con 20 ml de agua destilada, volviéndose a desechar las correspondientes fases acuosas. La fase orgánica definitiva se dispuso en un matraz Erlenmeyer, al que se agregaron unos 15 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro como agente desecante, a fin de eliminar cualquier residuo de fase acuosa. Se dejó en reposo durante por lo menos 30 minutos, al cabo de los cuales dicho desecante se separa por filtración a través de una placa porosa conectada a una bom-

ba de vacío, recogién<sup>do</sup>se la fase orgánica en un matraz esférico. El disolvente de dicha fase orgánica se evaporó en un rotavapor, quedando un residuo seco de lípidos insaponificables que fueron redisueltos en éter etílico y trasvasados a un vial con ayuda de una pipeta Pasteur. El éter se evaporó sobre una superficie a 50°C, guardándose la muestra insaponificable bien tapada en frigorífico a 4°C hasta su medida. Para ello, dicho residuo lipídico se redisolvió en 1 ml de cloroformo, del que se tomaron a continuación dos muestras alícuotas -0.1 y 0.2 ml-, que se depositaron en sendos viales de medida. Una vez el cloroformo se hubo evaporado totalmente -etapa importante, puesto que es un compuesto productor de una considerable extinción-, se adicionaron 10 ml de un líquido de centelleo compuesto por:

PPO	5 g
POPOP	0.3 g
Tolueno	934 ml
Acetato de etilo	66 ml

Los viales se agitaron hasta una completa solubilización de las muestras, midiéndose finalmente su radiactividad en un contador de centelleo líquido que utiliza un programa de doble marca do -para  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ - elaborado tras efectuar la correspondiente gráfica de calibrado. Para ello -y como agente productor de extinción-, se utilizó un extracto de lípidos insaponificables procedentes de hígado y riñón de pollo. Dicho programa permite además llevar a cabo la corrección de las d.p.m. (desintegraciones por minuto) debidas al  $^{14}\text{C}$ , con arreglo al porcentaje de recuperación de su correspondiente estándar interno  $^{-3}\text{H}$ - después de la etapa de extracción.

**B.1.a.6. Fraccionamiento de los lípidos insaponificables. Medida de la radiactividad de las distintas fracciones.**

Para la separación de las distintas fracciones insaponifica

bles, se utilizó la técnica descrita por Raskin y Siperstein (1974) basada en una cromatografía en capa fina que posibilita la separación de esteroides  $C_{27}$  -tipo colesterol-, esteroides  $C_{30}$  -tipo lanosterol-, óxidos de escualeno -que migran junto a la ubiquinona-, escualeno y un conjunto amplio de insaponificables de carácter relativamente polar.

En la preparación de la capa fina se utilizaron placas de vidrio de 20x5 cm, previamente deslipidizadas con acetona. Se preparó -en un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado- una suspensión de 50 g de silicagel 60 G en 100 ml de agua destilada, agitando vigorosamente durante 2 minutos. Transcurridos éstos, se vierte dicha suspensión en el dispositivo extensor -ajustado para un espesor de capa de 0.5 mm- que se hace deslizar uniformemente sobre las placas depositando en ellas el silicagel. Se dejan secar al aire y se introducen posteriormente en una estufa a 120°C durante 2 horas con el fin de conseguir una pérdida total de humedad (proceso de "activación").

De las muestras de insaponificables totales, se tomó una alícuota -cuyo volumen represente como mínimo de un 15-20% del total-, que se depositó en forma de banda estrecha a una distancia de 2 cm del borde inferior de la placa activada con ayuda de una micropipeta de enrase por estrangulamiento.

A fin de identificar las distintas fracciones insaponificables, se desarrolló junto a cada tanda otra placa, en la que se dispusieron de forma análoga pequeñas cantidades de escualeno, ubiquinona, lanosterol y colesterol no marcados, cuyos  $R_f$  respectivos constituyen el patrón con el que se compararon los de las bandas obtenidas de cada muestra de insaponificables totales.

Las placas se introdujeron en un recipiente paralelepípedo de vidrio -dimensiones 30x30x10 cm- provisto de una tapa con bordes esmerilados, lo que permite su cierre hermético. En dicho



recipiente se dispusieron 150 ml de disolvente, dejándose saturar su atmósfera interior durante 20 horas como mínimo -a lo cual también contribuyó la utilización de papeles de filtro adheridos a las paredes laterales de aquél.

La técnica adoptada consistió en dos desarrollos diferentes:

\* El primero, utilizó como disolvente una mezcla de acetato de etilo y benceno -1:5 vol/vol-, finalizando al alcanzar el frente una distancia equivalente a las 3/4 partes de la longitud total de la placa. Una vez fuera de la cámara cromatográfica, dichas placas se dejaron secar durante 1 hora bajo una corriente de aire caliente.

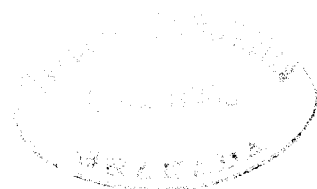
\* El segundo desarrollo se llevó a cabo en presencia de la mezcla heptano-benceno -97:3 vol/vol-, permitiéndose avanzar al frente hasta el límite superior del silicagel y secándose éste posteriormente con aire caliente.

A fin de visualizar las distintas fracciones, se introdujeron las placas totalmente secas en una cubeta que contiene iodo sublimado, el cual -debido a la capacidad que presenta de adicionarse a dobles enlaces- va a posibilitar la aparición de bandas coloreadas (tonalidad parduzca típica) que corresponden a dichas fracciones insaponificables.

Los valores de  $R_f$  que se consideraron para cada fracción fueron -según los obtenidos con los patrones- los siguientes:

Compuesto que migra como	R <sub>f</sub>
Escualeno	0.79
Ubiquinona	0.63
Lanosterol	0.38
Colesterol	0.27
Insaponificables polares	0.00-0.22

El contorno de cada banda se señaló con un punzón e inmediatamente se procedió a la completa eliminación del yodo de las mismas, colocando las placas bajo una corriente de aire frío durante 1 hora. Desaparecido el color, se rasparon las zonas de silicagel delimitadas por el punteado y se dispusieron en viales de medida, añadiéndose a continuación 10 ml del mismo líquido de centelleo utilizado para cuantificar la radiactividad de insaponificables totales (composición ya descrita en el apartado B.1.a.5.). Después de una agitación vigorosa durante unos 10 segundos -con objeto de que los distintos compuestos se solubilizaran perfectamente-, se midió su radiactividad en un contador de centelleo líquido empleando un programa para doble marcado  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ - que se preparó una vez realizada la correspondiente gráfica de calibrado. El agente productor de extinción utilizado fue una mezcla de silicagel y un extracto de insaponificables procedentes de hígado y riñón de pollo. Al igual que el programa destinado a la medida de lípidos insaponificables totales (apartado B.1.a.5.), permitió corregir las d.p.m. correspondientes al  $^{14}\text{C}$  según la recuperación del  $^3\text{H}$  empleado como estándar interno.



B.2. ESTUDIOS *IN VITRO*

B.2.a. Metabolismo del acetato y MVA: incorporación a lípidos insaponificables y producción de CO<sub>2</sub>

B.2.a.1. Preparación de los sustratos marcados y del estándar interno

El sustrato empleado fue [1-<sup>14</sup>C]acetato sódico, que se preparó inicialmente -según se describió en el apartado B.1.a.1.- a concentración 1 mM y 50 µCi/ml. Sin embargo, en la mayor parte de estos experimentos *in vitro* -y siempre que no se indique lo contrario- se utilizó una disolución de dicho sustrato 60 mM y 25 µCi/ml (lo que representa una radiactividad específica de 0.42 µCi/µmol), por lo que a dicha concentración original se le añadió la cantidad adecuada de acetato no marcado.

Para estudiar en estas condiciones el metabolismo del MVA, se utilizó (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonolactona con una actividad específica inicial de 18 µCi/µmol. Se preparó disolviendo el contenido de la ampolla -junto con la cantidad adecuada de mevalonolactona no marcada- en un volumen apropiado de una solución de KOH en exceso, durante 30 minutos y a 37°C. La sal potásica del MVA así obtenida fue 2 mM y 8 µCi/ml -proporcionando, por tanto, una radiactividad específica de 4 µCi/µmol-, manteniéndose en congelador a -20°C.

Por otra parte, y como estándar interno para cuantificar el rendimiento del proceso de aislamiento de los lípidos insaponificables totales, se utilizó la misma disolución de colesterol tritiado citada en el apartado B.1.a.1. .

### B.2.a.2. Obtención del tampón de incubación

Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de tampón Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 , que se preparó a partir de una mezcla salina con la siguiente composición:

NaCl	0.154 M	100 ml
KCl	0.154 M	4 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.11 M	3 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.154 M	1 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.154 M	1 ml

Este volumen total de mezcla se gaseó durante 10 minutos con carbógeno -95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>- a fin de evitar la precipitación del Ca<sup>2+</sup>, añadiéndose a continuación 21 ml de una solución ex-temporánea de NaHCO<sub>3</sub> 0.154 M. El pH resultante del tampón -para dichas proporciones- resultó ser de 7.4 .

### B.2.a.3. Preparación de las muestras tisulares

Los animales se sacrificaron por decapitación antes de que se iniciase la fase lumínica del ciclo, es decir, entre las 8.30 y 9.00 a.m. . Se extrajeron rápidamente los órganos a estudiar, disponiéndose en la mezcla salina fría ya citada en el apartado anterior. Una vez limpios de restos de sangre y adherencias de grasa, se procedió a la obtención de muestras para la incubación, que fueron de dos tipos:

\* Cortes finos de 0.2 mm de grosor -obtenidos con microtomo manual- a partir de hígado y riñón.

\* Raspado de la mucosa correspondiente al asa duodenal, se parándola de los demás componentes de dicha porción intestinal (capas muscular y adventicia).

Las cantidades de muestras de tejido utilizadas en la mayor parte de las incubaciones fueron -salvo cualquier otra indicación expresa- las siguientes:

<u>Muestra tisular</u>	<u>Incubación con acetato</u>	<u>Incubación con MVA</u>
Cortes de hígado	75 mg	150 mg
Cortes de riñón	100 mg	200 mg
Raspado de mucosa duodenal	150 mg	---

#### B.2.a.4. Procedimiento de incubación

Las incubaciones se llevaron a cabo según la técnica de Righetti y col.(1976), con ligeras modificaciones que se describen a continuación.

Se utilizaron matraces de forma cónica de 25 ml de capacidad, con tapón de rosca perforable y provistos en su base de un pocillo central de 1 ml.

Un volumen de 1.9 ml de tampón Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 frío, así como la cantidad adecuada de muestra tisular, se dispusieron en el matraz fuera del pocillo central. También en ese mismo compartimento se pipeteó -a menos que se indique lo contrario- 0.1 ml de la solución de acetato 60 mM preparada como ya se describió en el apartado B.2.a.1. . Al final resultó, por tanto, una concentración de acetato en el medio de incubación de 3 mM y 1.25  $\mu$ Ci/ml.

En las incubaciones con MVA, además de los 1.9 ml de tampón Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 y la cantidad apropiada de cortes de tejido, se dispuso en el matraz un volumen de 0.1 ml de

la solución de MVA 2 mM obtenida según se describió en B.2.a.1. , con lo que al final se obtuvo una concentración 0.1 mM y 0.4  $\mu\text{Ci/ml}$  de dicho precursor en el medio.

Seguidamente, los matraces fueron gaseados durante 30 segundos con carbógeno, se cerraron herméticamente con el tapón de rosca perforable y se dispusieron en el incubador metabólico para su agitación a 37°C con un ritmo de unas 100 oscilaciones por minuto. Los tiempos de incubación fueron -salvo otra indicación al respecto- de 1 hora para las muestras con acetato y 2 horas para las de MVA.

Transcurridos dichos tiempos, se inyectó -a través del tapón- 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N directamente en el medio de incubación, con la doble finalidad de detener la reacción y transformar el bicarbonato producido en el curso de la misma -que se encontraba disuelto- en su forma anhidrida y gaseosa ( $\text{CO}_2$ ), estado al cual pasó a la atmósfera interior del matraz.

#### B.2.a.5. Recogida y medida del $^{14}\text{CO}_2$ producido

Inmediatamente después de detener la reacción, se inyectó de modo análogo -pero esta vez dentro del pocillo-, un volumen de 0.4 ml de NaOH 3N sobre el que se fue "recogiendo" nuevamente dicho  $^{14}\text{CO}_2$  al estado de sal soluble. Con el fin de facilitar este proceso de captación, así como de asegurar que ocurrió de forma completa, los matraces se sometieron a una reincubación de 30 minutos en las mismas condiciones ya descritas. Concluida ésta se abrieron dichos matraces, tomándose de la solución del pocillo dos muestras alícuotas:

\* 0.05 y 0.1 ml de los matraces incubados con acetato

\* 0.1 y 0.2 ml de los incubados con MVA

Dichos volúmenes se depositaron en sendos viales de medida que ya contenían 10 ml de líquido de centelleo compuesto por:

PPO	2 g
POPOP	0.02 g
Tolueno	500 ml
Metanol	500 ml

Tras una breve agitación, se midió su radiactividad en un contador de centelleo líquido con un programa para  $^{14}\text{C}$ , preparado tras realizar la gráfica de calibrado correspondiente y utilizando una mezcla de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $\text{NaOH}$  3N como productor de extinción.

Por otra parte, se constató el elevado porcentaje de recuperación del  $\text{CO}_2$  durante la etapa de reincubación -entre un 95 y un 100%- , empleando para ello un adecuado estándar externo de  $\text{Na}^{14}\text{CO}_3\text{H}$ .

B.2.a.6. Aislamiento de los lípidos insaponificables totales.  
Medida de su radiactividad

Finalizados los períodos de incubación y reincubación de las muestras, y una vez abiertos los matraces, se añadió el estándar interno al medio de incubación. Dicho estándar está constituido por el  $[7(n)-^3\text{H}]$ colesterol citado en el apartado B.2.a.1. , utilizando en cada caso un número de c.p.m. entre 6 y 10 veces superior a las correspondientes de  $^{14}\text{C}$  en los insaponificables. Inmediatamente se trasvasó dicho medio de incubación -con su estándar- a un matraz Erlenmeyer para su hidrólisis y saponificación, según idéntico procedimiento al descrito para las condiciones *in vivo* (apartado B.1.a.5.). Asimismo, el proceso de extracción que conlleva el aislamiento de los insaponificables totales, obedeció al mismo protocolo indicado en dicho apartado.

La radiactividad de los viales que contienen las muestras, se midió en un contador de centelleo líquido que utiliza el mismo programa descrito para las condiciones *in vivo*.

**B.2.a.7. Fraccionamiento de los lípidos insaponificables totales. Evaluación de la radiactividad de las fracciones**

Se utilizó la misma técnica cromatográfica que en las condiciones *in vivo* (apartado B.1.a.6.).

Asimismo, el conteo de la radiactividad exhibida por las distintas fracciones se efectuó siguiendo las mismas indicaciones que en los estudios *in vivo*.

**B.2.b. Actividad HMG-CoA reductasa**

**B.2.b.1. Preparación del sustrato marcado y del estándar interno**

En la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa se empleó como sustrato [3-<sup>14</sup>C]HMG-CoA con una radiactividad específica inicial de 29  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ . El contenido de la ampolla se disolvió en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 5.8 a fin de obtener una disolución de 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  y 0.17 mM, que se mantuvo a -20°C.

Debido a que se utilizó una disolución de dicho sustrato 2 mM y 2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  -lo que proporciona una actividad específica de 1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ -, fue necesario añadir la cantidad adecuada de HMG-CoA no marcado.

Por otra parte, para cuantificar la recuperación del producto, se dispuso un estándar interno de [2-<sup>3</sup>H]mevalonolactona que contiene aproximadamente 0.2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . Se conserva a -20°C.



#### B.2.b.2. Determinación de la actividad

Se adoptó el método de Shapiro y col.(1974), modificado por Alejandre y col.(1981) según se describe a continuación.

Una vez obtenidas las fracciones microsomales de los tejidos a estudiar -procedimiento de Dugan y col.(1972)-, se resuspendieron en el volumen apropiado de tampón fosfato potásico con protectores y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Para la reacción enzimática, se dispuso 0.1 ml de dicha suspensión microsomal en tubos Eppendorf de polietileno provistos de tapón y se preincubaron a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se inició la reacción propiamente dicha por adición de 25 µl de la solución de HMG-CoA 2mM -preparada como se describió en el apartado anterior- y de 25 µl de un sistema regenerante de NADPH (que contiene 4.5 µmol de glucosa-6-P, 0.3 U.I. de glucosa-6-P deshidrogenasa y 0.45 µmol de NADP en dicho volumen del mismo tampón utilizado para la obtención de las suspensiones microsomales). En el volumen final de reacción, por tanto, el sustrato se encuentra a concentración 0.33 mM y 0.33 µCi/ml. Los tubos -una vez cerrados- se agitaron bien y se incubaron durante 30 minutos a 37°C.

Finalizado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo añadiendo 25 µl de HCl 10N. En ese mismo momento, se agregó el estándar interno de [2-<sup>3</sup>H]mevalonolactona -referido en el apartado anterior- en un volumen adecuado para que contenga entre 6 y 10 veces más c.p.m. que las debidas al [3-<sup>14</sup>C]mevalonolactona, producto de dicha reacción enzimática. Una vez más se taparon y agitaron los tubos, manteniéndose otros 30 minutos a 37°C para la completa lactonización del MVA sintetizado.

Al final, se centrifugaron dichos tubos durante 1 minuto a 10000 x g con objeto de sedimentar las proteínas -precipitadas a

consecuencia de la acidificación del medio- y evitar así su inter<sub>ferencia</sub> en el posterior desarrollo cromatográfico que constituye la etapa de aislamiento del producto de la reacción.

En dicha etapa, se procedió a la separación -mediante cro<sub>matografía</sub> en capa fina- de la mevalonolactona originada, para lo cual se dispusieron sobre placas activadas de silicagel 60G mues<sub>tras</sub> alícuotas de 0.1 ml del sobrenadante resultante de la última centrifugación. Se desarrollaron totalmente en una mezcla benceno-acetona 1:1 (vol/vol), raspándose a continuación la zona de placa delimitada por los R<sub>f</sub> 0.38 - 0.7 (correspondiente a la mevalonolactona) sobre viales de medida que contenían 10 ml de lí<sub>quido</sub> de centelleo con la siguiente composición:

PPO	7 g
Dimetil POPOP	0.3 g
Naftaleno	100 g
Dioxano	1000 ml

Dichos viales se agitaron bien y se midió su radiactividad en el contador de centelleo, utilizándose un programa adecuado de doble marcado.

#### B.2.c. Actividad PPMVA descarboxilasa

##### B.2.c.1. Obtención del sustrato radiactivo

Para determinar la actividad descarboxilasa del MVA, se empleó (R,S)-[1-<sup>14</sup>C]mevalonolactona como sustrato, cuya actividad específica inicial fue de 6 µCi/µmol.

En su preparación, se disolvió el contenido del vial -jun

to con la cantidad apropiada de mevalonolactona no marcada- en un volumen adecuado de solución de KOH (en exceso respecto de los equivalentes de ácido existentes), manteniéndose a 37°C durante 30 minutos. El MVA así obtenido, presentó una concentración 2 mM y 1.8  $\mu\text{Ci/ml}$  -lo que proporciona una radiactividad específica de 0.92  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ -, guardándose a 4°C hasta su utilización.

#### B.2.c.2. Método de determinación

Se siguió la técnica descrita por Ramachandran y Shah (1976), modificada por González-Pacanowska y col. (1984) tal y como se describe a continuación.

Después de la centrifugación diferencial pertinente, se obtuvieron las preparaciones enzimáticas -sobrenadantes de la efectuada a 105000 x g-, que constituyeron las muestras a ensayar una vez diluídas convenientemente, a fin de que contengan la concentración proteica adecuada.

Para la reacción se utilizaron matraces cónicos con cierre perforable hermético y provistos de un pocillo central. En el compartimento principal (exterior a dicho pocillo), se pipeteó 0.75 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.4 -que contenía 3.5  $\mu\text{mol}$  de ATP-, 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0.1 M, 50  $\mu\text{l}$  de la solución de  $[1-^{14}\text{C}]$ mevalonolactona 2 mM -preparada según se describe en el apartado anterior- y 150  $\mu\text{l}$  de la muestra enzimática correspondiente. Al final resulta, por tanto, una concentración de sustrato 0.1 mM y 0.09  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Una vez cerrados, los matraces se incubaron durante 30 minutos a 37°C, con un ritmo de aproximadamente 70 agitaciones por minuto. Al cabo de este tiempo, se inyectó a través del tapón 0.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N, para detener la reacción y provocar el desprendimiento del  $\text{CO}_2$  -en estado gaseoso- del medio de incubación. Al mismo tiempo, también se inyectó dentro del pocillo 0.4 ml de

solución de NaOH 3N, sobre la que se fue absorbiendo dicho CO<sub>2</sub> durante 60 minutos en continua agitación.

Finalmente, se tomaron muestras alícuotas de 0.1 ml del contenido del pocillo que se introdujeron en viales de medida con 10 ml del siguiente líquido de centelleo:

PPO	2 g
POPOP	0.02 g
Tolueno	1500 ml
Metanol	500 ml

Tras una vigorosa agitación, se midió su radiactividad en contador de centelleo líquido utilizando un programa adecuado para <sup>14</sup>C.

Asimismo, se comprobó la recuperación del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> obtenido durante todo el proceso mediante el empleo de un adecuado estándar externo de Na<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>H.

### B.3. ESTUDIOS SOBRE LA FUNCION TIROIDEA

#### B.3.a. Alteraciones del estado normotiroideo : tratamientos ensayados

Con la finalidad de inducir experimentalmente alteraciones en el estado normotiroideo de los animales, fueron éstos sometidos a los distintos tratamientos que se describen en esta parte de la presente Memoria.

##### B.3.a.1. Selección y marcado de los animales

Una vez recibidos de la granja suministradora, los pollos recién nacidos fueron pesados, seleccionándose los del mismo peso corporal. A continuación se procedió a su clasificación en dos tandas o grupos: controles y tratados. A fin de facilitar su identificación durante el período en que son sometidos a tratamiento, fueron marcados con etiquetas adheridas a las patas y en las que figuraban todos los datos relativos a su número de orden, grupo, dosis administrada y duración del tratamiento.

Una vez etiquetados, la totalidad de los animales seleccionados como controles y tratados se dispusieron juntos en la jaula de la cámara de cría, a fin de que en todo momento se encontrasen en idénticas condiciones, permitiéndoseles el libre acceso a la comida y bebida.

##### B.3.a.2. Obtención de los distintos preparados

Los compuestos que constituyen los distintos tratamientos a que fueron sometidos los animales, se prepararon como se describe a continuación.

(1) L-Tiroxina(L-T<sub>4</sub>)

Es la 3,3',5,5'-tetraiodo-L-tironina, utilizada al estado de sal sódica pentahidratada.

Debido a su baja solubilidad en agua, fue preciso disolverla en un medio alcalino tal como la "solución salina básica", que se preparó solubilizando la cantidad adecuada de NaOH en solución salina fría, para que resultase una concentración 0.02 N en dicho álcali. A partir de ella, se obtuvo una solución de tiroxina cuya concentración resultante -una vez ajustado el pH hasta 8.5 con ClH- fue de 1 mg/ml. Así preparada, constituyó la denominada "solución madre" que se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

(2) L-T<sub>3</sub>

Es la 3,5,3'-triiodo-L-tironina, empleada al estado de sal sódica.

Al igual que la T<sub>4</sub> es muy poco soluble en agua, por lo que se disolvió en la misma "solución salina básica" preparada en el apartado anterior.

En este caso, se preparó a una concentración de 0.05 mg/ml -tras haber ajustado el pH a 8.5- y se reservó congelada a -20°C, constituyendo la "solución madre" de dicha hormona.

(3) PTU

Es el 6-n-propil-2-tiouracilo.

Compuesto poco soluble en agua, debe disolverse en la misma "solución salina básica" que los anteriores.

La concentración resultante -una vez ajustado el pH hasta aproximadamente 8.5- fue de 4.5 mg/ml.

### B.3.a.3. Administración de los preparados

La administración de los distintos preparados se llevó a cabo siempre mediante inyección única y diaria durante todo el período de tratamiento, cuya duración y dosis ensayadas se describen a continuación.

Ante todo se aclarará que, para los preparados de L-T<sub>4</sub> y PTU se optó por la vía intraperitoneal, puesto que en muchos casos fue necesario inyectar animales a partir de los 3 días de vida, edad a la cual existe una dificultad manifiesta para la utilización de la otra modalidad -subcutánea en la zona del cuello-, adoptada en la administración de L-T<sub>3</sub> y PTU a pollos de mayor edad.

\* La L-T<sub>4</sub> se administró, pues, intraperitonealmente, a dosis únicas de 10, 30 y 50 µg por 100 g de peso corporal y día, durante períodos de 3 y 7 días de duración. El volumen de cada inyección fue de 0.2 ml, por lo que la "solución madre" correspondiente -obtenida según se describió en el apartado B.3.a.2.(1)- tuvo que diluirse convenientemente con solución salina, a fin de que en dicho volumen final existiesen las referidas cantidades de tiroxina.

A los animales considerados "controles" se les inyectó un volumen semejante del mismo disolvente que sus respectivos tratados.

\* La L-T<sub>3</sub>, por su parte, se utilizó vía subcutánea a dosis únicas de 5 y 10 µg por cada 100 g de peso corporal y día, durante 7 días consecutivos y en pollos de tres edades distintas: 15, 30 y 60 días. Teniendo en cuenta que el volumen inyectado fue de 0.2 ml, la "solución madre" de L-T<sub>3</sub> se diluyó con el volumen apropiado de solución salina, para que existiesen las dosis referidas en cada inyección.

Los correspondientes "controles" fueron inyectados con

igual volumen de disolvente similar al de los animales sometidos a tratamiento.

\* El tratamiento con PTU se administró tanto por inyección intraperitoneal como subcutánea, dependiendo de la edad de los animales. Con los de 11 a 15 días se llevaron a cabo los experimentos en condiciones *in vivo*, utilizándose una dosis única de 1 mg por 100 g de peso corporal y día, durante dos períodos de 5 y 10 días consecutivos. En los ejemplares de mayor edad -15, 30 y 60 días-, se inyectó asimismo una dosis única de 1 mg por cada 100 g de peso corporal y día, a lo largo de 7 días ininterrumpidamente, comprobándose los efectos producidos en condiciones *in vitro*.

En ambos casos, la solución de PTU empleada fue la que se preparó como se indica en B.3.a.2.(3), inyectándose en cada caso el volumen correspondiente a las cantidades ensayadas del compuesto en cuestión.

Asimismo, y como animales control, se inyectaron pollos con un mismo volumen de idéntico vehículo al utilizado en los correspondientes tratados.

#### B.3.b. Determinación de los niveles de hormonas tiroideas circulantes

Para constatar si se ha producido alteración alguna en la función tiroidea de los animales -como consecuencia de los distintos tratamientos a que fueron sometidos-, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de la tasa de hormonas tiroideas circulantes en muestras de suero, mediante una técnica altamente sensible: el radioinmunoensayo.



### B.3.b.1. Extracción de las muestras

Previamente al momento del sacrificio, los animales fueron rápidamente anestesiados por inhalación de vapores de éter etílico, procediéndose a realizar una incisión en la piel que dejó al descubierto la zona inguinal. Después de diseccionar una pequeña área de la capa muscular externa del muslo, próxima a dicha zona, se hizo visible el tramo superior de la vena femoral. Mediante jeringuillas desechables de polietileno mantenidas a 0°C y ligeramente heparinizadas -a fin de reducir al máximo el riesgo de hemólisis, así como la posible obturación de la aguja de que va provista-, se llevó a cabo la extracción de aproximadamente 1 ml de sangre por punción de dicha vena. Se vació la jeringa en un tubo de vidrio y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, tiempo suficiente para que se produzca la retracción del coágulo. A continuación, se centrifugaron los tubos a 10000 x g, separándose el suero obtenido con ayuda de una pipeta Pasteur. Dichas muestras de suero se conservan en congelador a -20°C hasta el momento de la determinación.

### B.3.b.2. Procedimiento de medida

Los niveles séricos totales de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> fueron determinados mediante un radioinmunoensayo en fase sólida, basado en la competencia -durante un tiempo fijo- entre la hormona marcada con <sup>125</sup>I y la existente en la muestra, por los centros de unión a un anticuerpo específico (anti-hormona). Durante el proceso, se impidió la unión de la hormona a proteínas enlazantes de la misma, mediante el empleo de agentes bloqueantes.

Como consecuencia de dicha interacción, se formaron dos tipos de complejo antígeno-anticuerpo:

- a. Uno, con antígeno marcado con <sup>125</sup>I (Ag\* -Ac)

b. Otro, con antígeno sin marcar (Ag-Ac)

La proporción de complejos marcados está en función de la concentración presente de antígeno sin marcar (Ag), ya que las cantidades de antígeno marcado ( $Ag^*$ ) y anticuerpo (Ac) no varían a lo largo de dicho proceso. En virtud de ello, la actividad debida a esos complejos marcados -una vez eliminado del medio el exceso de antígeno marcado libre- permitió cuantificar la concentración de antígeno (hormona) de la muestra, en base a una gráfica de calibrado previamente elaborada.

La metodología seguida se describe detalladamente y a continuación para cada hormona.

(1)  $T_4$

El contenido del "kit" utilizado en la determinación de esta hormona es:

\* Tubos revestidos de anticuerpo (anti- $T_4$ )

\* Vial con una solución tamponada de [ $^{125}I$ ] $T_4$ , cuya actividad es aproximadamente 0.05  $\mu$ Ci/ml. Contiene los agentes bloqueantes ya referidos.

\* 6 patrones de calibrado, constituidos por las siguientes concentraciones de  $T_4$ : 0, 1, 4, 10, 16 y 24  $\mu$ g/100 ml.

Una vez etiquetados los tubos -6 patrones y las muestras-, se pipetearon en cada uno 25  $\mu$ l de las correspondientes soluciones de antígeno sin marcar ( $T_4$ ) por duplicado, directamente en el fondo de los mismos. A continuación se añadió 1 ml de solución del antígeno marcado ([ $^{125}I$ ] $T_4$ ), agitándose bien. Se incubaron los tubos a 37°C durante 60 minutos, transcurridos los

cuales se decantaron cuidadosamente. Por último, se midió su radiactividad en el contador durante 1 minuto.

El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó por interpolación en la recta de calibrado elaborada con los correspondientes tubos patrón.

(2)  $T_3$

En este caso, el contenido del "kit" es similar al anterior, excepto la actividad de la solución de [ $^{125}I$ ]T<sub>3</sub> -que fue de unos 0.03  $\mu$ Ci/ml- y las concentraciones de los patrones: 0, 20, 50, 100, 200 y 600 ng/100 ml.

El procedimiento a seguir se diferencia del anterior en el volumen de soluciones patrón y muestra utilizados -100  $\mu$ l-, así como el tiempo de incubación de los tubos: 120 minutos.

El cálculo de los niveles de dicha hormona también se efectuó por interpolación en la recta de calibrado.

#### B.4. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

La totalidad de los resultados experimentales vienen expresados como el valor medio ( $\bar{x}$ ) de entre los encontrados en distintos animales afectado de su correspondiente error estándar (E.E.), y calculados ambos según las expresiones:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1 x_1}{n} \qquad \text{E.E.} = \frac{\sigma_{n-1}}{n}$$

siendo  $x_1$  el valor de la muestra,  $n$  el número de datos experimentales y  $\sigma_{n-1}$  la desviación típica muestral, de expresión

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_1 (x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Para la evaluación de los resultados obtenidos en los distintos tratamientos ensayados, se utilizaron los test de significación que se describen a continuación.

#### T-Student para muestras independientes

Dadas dos muestras  $x_{1i}$  y  $x_{2j}$  (donde  $i=1, \dots, n_1$  y  $j=1, \dots, n_2$ ) de dos variables normales de medias  $\mu_1$  y  $\mu_2$  desconocidas, para contrastar si son iguales o no, se calculan las medias ( $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$ ) y varianzas ( $s_1^2$  y  $s_2^2$ ) de ambas muestras, así como el valor  $F_{exp} = s_1^2/s_2^2$  (debe resultar siempre  $s_1^2 > s_2^2$ ). Este, se compara con una  $F_{10\%}$  (para  $n_1-2$ ,  $n_2-2$  g.d.l.) de la distribución de Snedecor, como test de homogeneidad de varianzas previo al de homogeneidad de medias.

Puede resultar:

\* Que  $F_{exp} < F_{10\%}$  (TEST DE STUDENT)

Se calcula el estadístico  $t_{exp}$ :

$$t_{exp} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{s^2 \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

siendo  $s^2$ :

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Dicho valor  $t_{exp}$  se compara con una  $t$  (para  $n_1 + n_2 - 2$  g.d.l.) de la distribución de Student.

\* Que  $F_{exp} > F_{10\%}$  (TEST DE WELCH)

Se calcula  $t_{exp}$ :

$$t_{exp} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

y se compara con una  $t$  (para  $f$  g.d.l.) de la distribución de Student.

El valor de f es:

$$f = \frac{\left[ \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right]^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}}$$

La existencia de significación es un indicador de la DIFERENCIA ENTRE DICHAS MEDIAS.



V. RESULTADOS Y DISCUSION





A. EXPERIENCIAS *IN VIVO*



A.1. ESTUDIO DETALLADO DEL METABOLISMO DEL ACETATO EN HIGADO, MUCOSA DUODENAL, RIÑON Y CEREBRO

Dada la importancia universalmente reconocida del hígado y de la mucosa duodenal en la síntesis de colesterol en animales, se ha estudiado detenidamente la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales, así como su oxidación a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  para la obtención de energía. Del mismo modo, dada la contribución del riñón al metabolismo del mevalonato -precursor muy utilizado en la colesterogénesis-, ha parecido oportuno el estudio del metabolismo del acetato en este órgano con el fin de establecer las comparaciones oportunas entre los distintos tejidos u órganos del pollo. Por último, de acuerdo con la importancia del colesterol como constituyente de los lípidos del cerebro, y en especial de las vainas de mielina, se ha considerado de interés estudiar el metabolismo del acetato en condiciones próximas a una activa mielinización.

A.1.a. Producción de  $\text{CO}_2$

A.1.a.1. Efecto de la dosis de acetato

Se han llevado a cabo una serie de experiencias en las que se ha determinado la producción de  $\text{CO}_2$  tras 120 minutos de la inyección de diferentes dosis de acetato a pollos de 15 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Como se puede apreciar, la producción de  $\text{CO}_2$  por los animales es proporcional a la dosis de acetato inyectada, al menos dentro de los límites ensayados (Fig. 1).

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	CO <sub>2</sub> producido ( $\mu$ moles/120 min)
2	1.194 $\pm$ 0.090
4	1.501 $\pm$ 0.190
6	2.615 $\pm$ 0.267
8	3.142 $\pm$ 0.542
10	5.211 $\pm$ 0.334
15	7.034 $\pm$ 0.378
20	9.032 $\pm$ 1.204

TABLA 1. Efecto de la dosis de acetato inyectada en pollos de 15 días de edad sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración. Condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales.

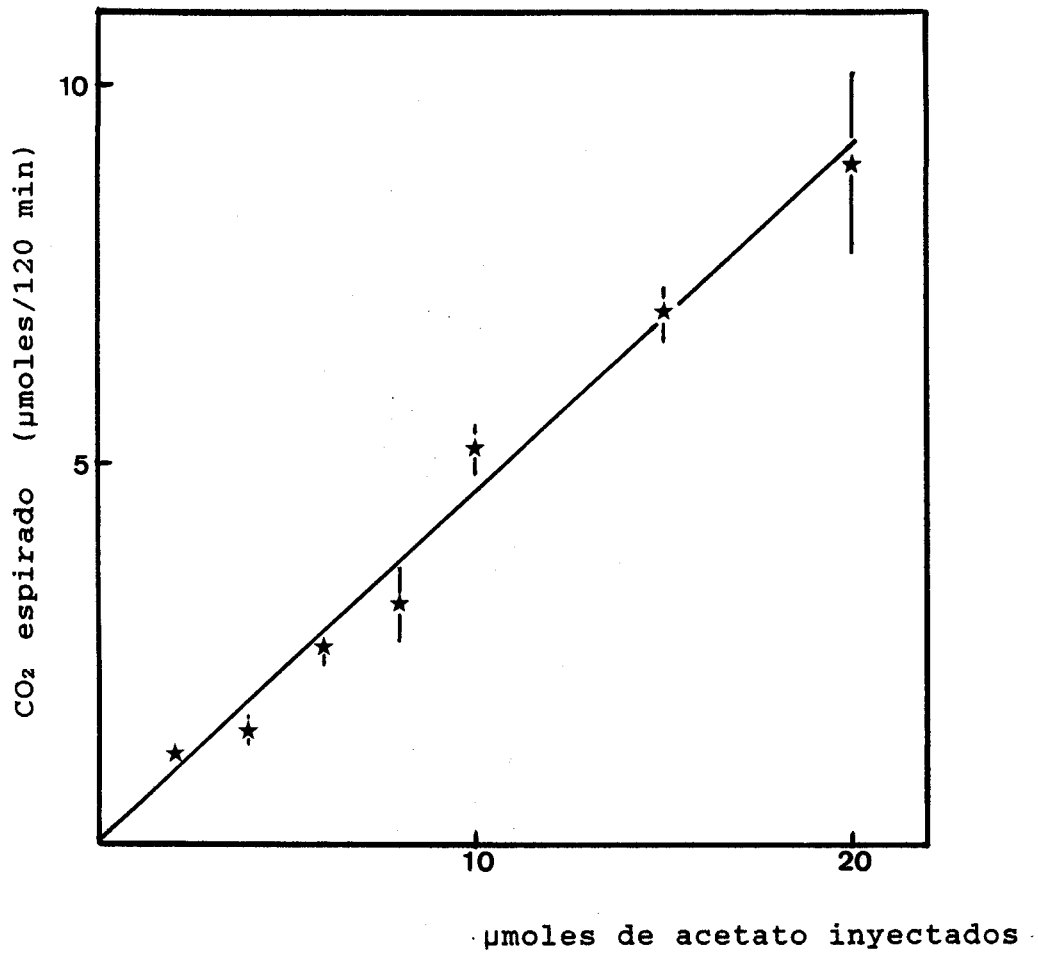


FIGURA 1

Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  en la respiración tras 120 minutos de la inyección de distintas dosis de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales.



#### A.1.a.2. Efecto del tiempo

En las experiencias antes mencionadas, los pollos se sacrificaron a las 2 horas de la inyección de acetato. Posteriormente, para precisar la evolución del metabolismo de dicho sustrato a lo largo del tiempo, se inyectaron a los animales 4  $\mu$ moles del mismo, midiéndose la producción de CO<sub>2</sub> a lo largo de un intervalo de tiempo comprendido entre 15 minutos y 12 horas. Como se puede observar en la Tabla 2, la máxima producción de CO<sub>2</sub> tiene lugar al cabo de 2 horas tras la inyección, si bien el aumento parece ser lineal tan sólo durante los primeros 60 minutos (Fig. 2), para disminuir tras períodos superiores a las 2 horas. Por otra parte, dicho valor máximo de CO<sub>2</sub> representa cerca del 50% de la dosis de acetato inyectada, lo que pone de manifiesto la importancia de este compuesto con fines energéticos en las condiciones de ensayo utilizadas.

#### A.1.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales

##### A.1.b.1. Efecto de la dosis de acetato

De acuerdo con las consideraciones anteriores, se ha estudiado la capacidad de incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales por los principales tejidos colesterogénicamente activos, en función de la dosis de sustrato inyectada. Los resultados descritos en la Tabla 3 ponen de manifiesto que la producción de lípidos insaponificables totales es máxima en el hígado, seguido a distancia por la mucosa duodenal, el cerebro y los riñones. En cualquiera de los tejidos estudiados se puede observar una clara proporcionalidad entre la cantidad de acetato incorporado y la inyectada (Fig. 3), al menos dentro de los límites ensayados.

Tiempo tras la inyección (min)	CO <sub>2</sub> producido (μmoles)
15	0.350 ± 0.012
30	0.848 ± 0.061
60	1.740 ± 0.123
120	1.875 ± 0.154
240	1.544 ± 0.049
720	1.181 ± 0.052

TABLA 2. Efecto del tiempo transcurrido sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración después de la inyección de 4 μmoles de acetato en pollos de 15 días de edad. Condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 5 animales.



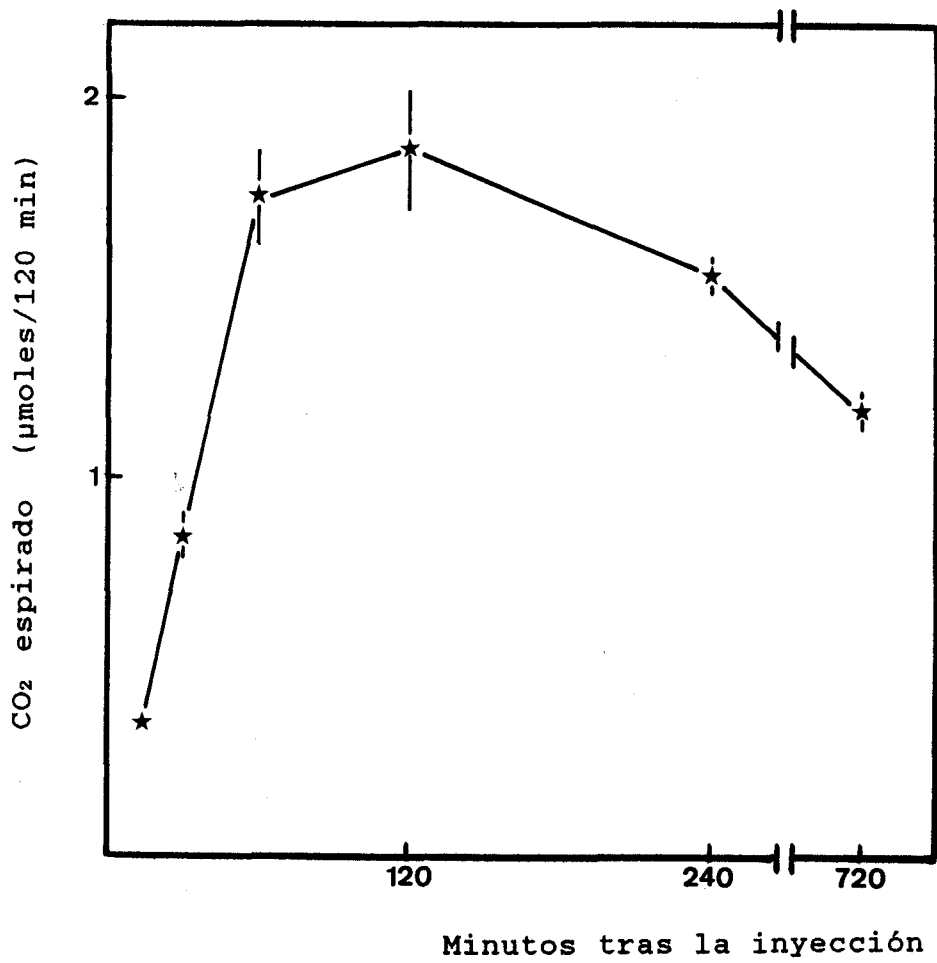


FIGURA 2

Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  en la respiración al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4 µmoles de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 5 animales.

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/120 min/g tejido)

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Hígado	Mucosa duodenal	Riñón	Cerebro
2	2.096 $\pm$ 0.328	0.378 $\pm$ 0.024	0.136 $\pm$ 0.006	0.188 $\pm$ 0.022
4	4.514 $\pm$ 0.506	0.590 $\pm$ 0.084	0.442 $\pm$ 0.052	0.512 $\pm$ 0.064
6	6.576 $\pm$ 0.442	1.452 $\pm$ 0.012	0.740 $\pm$ 0.104	0.642 $\pm$ 0.002
8	9.140 $\pm$ 0.304	1.604 $\pm$ 0.010	0.870 $\pm$ 0.098	1.306 $\pm$ 0.238
10	8.754 $\pm$ 2.510	1.632 $\pm$ 0.082	0.842 $\pm$ 0.228	1.626 $\pm$ 0.156
15	17.808 $\pm$ 2.186	2.742 $\pm$ 0.410	1.996 $\pm$ 0.104	2.140 $\pm$ 0.264
20	21.910 $\pm$ 1.710	3.534 $\pm$ 0.258	1.884 $\pm$ 0.558	3.476 $\pm$ 0.364

TABLA 3. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre su incorporación a lípidos insaponificables totales por distintos tejidos de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales.

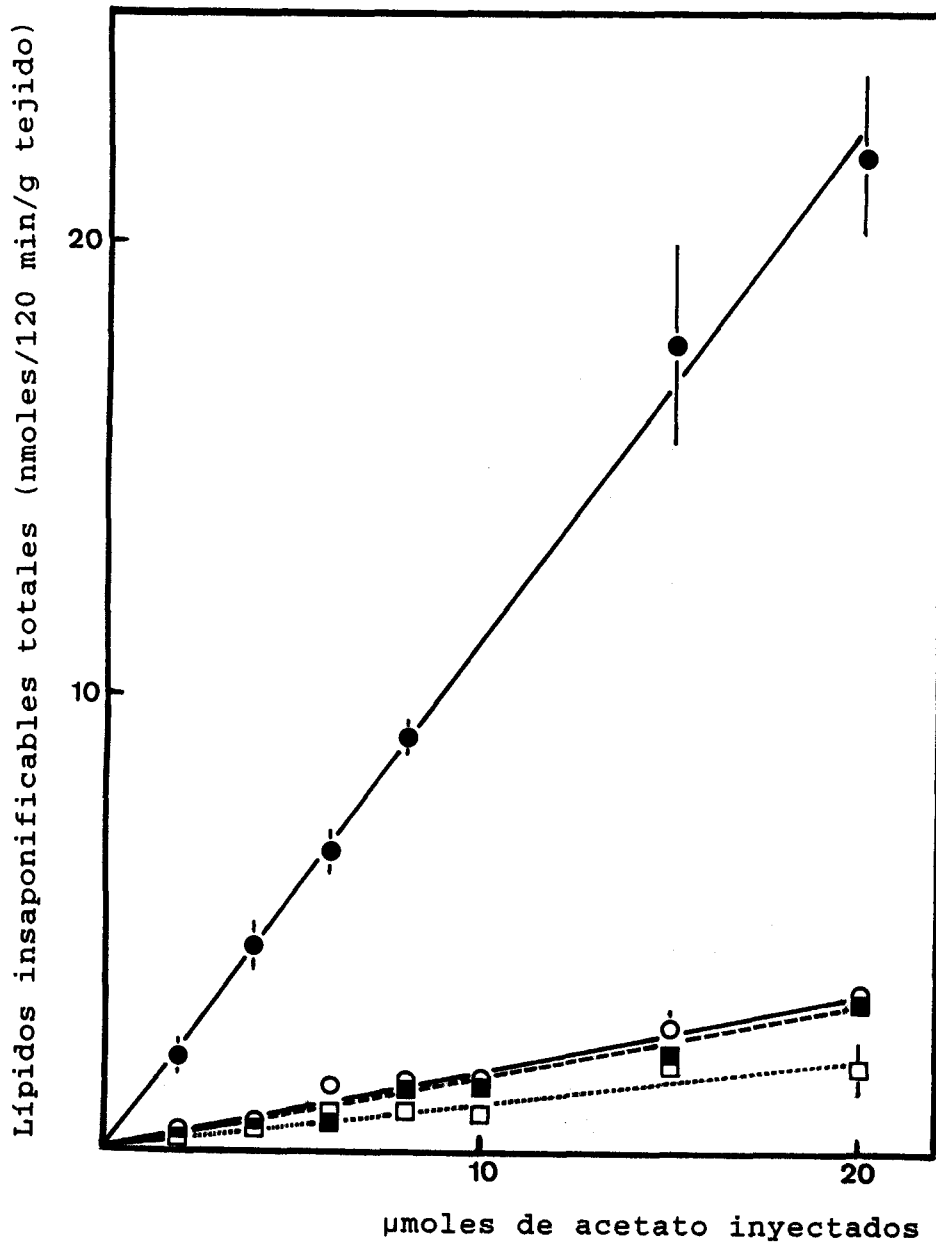


FIGURA 3

Incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en función de la dosis de sustrato inyectada en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales. (●) HIGADO, (○) MUCOSA DUODENAL, (□) RIÑON, (■) CEREBRO.

Si se tiene en cuenta el peso del órgano utilizado, se puede calcular la cantidad de acetato incorporado a lípidos insaponificables en el órgano completo. Como se observa en la Tabla 4, las diferencias entre hígado y el resto de los órganos son aún más acusadas, resultando una incorporación media al cabo de 2 horas del 0.39% en hígado, frente al 0.011% en riñón y 0.019% en cerebro.

Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Alejandre y col. (1981) sobre la actividad de la enzima HMG-Co A reductasa de pollo, punto clave del proceso de colesteroogénesis en distintos tejidos animales (Siperstein, 1970; Dietschy y Brown, 1974; Rodwell y col., 1976). Al cabo de 15 días de desarrollo posnatal -edad de los pollos utilizados en las experiencias de esta Memoria- la actividad reductasa es muy elevada en hígado, siendo claramente inferior en el resto de los tejidos (Alejandre y col., 1981), lo cual parece demostrar que la enzima no está regulada de una manera coordinada, sino que actúa de acuerdo con el papel desempeñado por cada tejido en la colesteroogénesis y de la que constituye el principal punto de control.

Por otra parte, la utilización de mevalonato como precursor del proceso biosintético en estudio, suministró unos resultados no del todo coincidentes con los anteriores. En efecto, en experiencias realizadas *in vivo*, el mevalonato fue incorporado a insaponificables totales mayoritariamente por el riñón -sobre todo cuando se inyectan dosis elevadas de sustrato (0.2-5  $\mu$ moles)-, presentando el hígado una capacidad incorporativa del orden de 3-4 veces inferior (Linares y col., 1983). Asimismo, el riñón presenta la máxima capacidad para metabolizar dicho mevalonato por cualquiera de sus rutas, en experiencias llevadas a cabo *in vitro* utilizando cortes de los diferentes tejidos (Aguilera y col., 1982). Esta función primordial del riñón en el metabolismo del mevalonato circulante y en su

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/120 min/órgano completo)

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Hígado	Mucosa duodenal	Riñón	Cerebro
2	5.772 $\pm$ 0.110	0.246 $\pm$ 0.008	0.109 $\pm$ 0.001	0.246 $\pm$ 0.001
4	15.627 $\pm$ 0.277	0.599 $\pm$ 0.002	0.478 $\pm$ 0.005	0.688 $\pm$ 0.004
6	23.088 $\pm$ 0.242	1.131 $\pm$ 0.001	0.881 $\pm$ 0.009	0.888 $\pm$ 0.002
8	36.852 $\pm$ 0.167	1.686 $\pm$ 0.001	1.118 $\pm$ 0.007	1.862 $\pm$ 0.017
10	27.400 $\pm$ 1.375	1.142 $\pm$ 0.002	0.959 $\pm$ 0.015	2.216 $\pm$ 0.016
15	56.754 $\pm$ 1.198	1.669 $\pm$ 0.015	1.996 $\pm$ 0.012	2.782 $\pm$ 0.020
20	64.459 $\pm$ 2.174	1.880 $\pm$ 0.093	1.888 $\pm$ 0.039	4.849 $\pm$ 0.030

TABLA 4. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre su incorporación a lípidos insaponificables totales por distintos órganos completos de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales.

incorporación a lípidos insaponificables, ha sido puesta de manifiesto también en rata (Hellström y col., 1973; Edmond, 1974; Edmond y Popjak, 1974; Raskin y Siperstein, 1976; Wiley y col., 1977), así como en ratón y conejo (Edgren y Hellström, 1972) y más recientemente en hombre y mono (McNamara y col., 1985).

El desvío metabólico del mevalonato a compuestos cetogénicos -también llamado "shunt" del mevalonato ó ruta de los "no esteroides"- se ha estudiado previamente midiendo la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  formado a partir de (R)-[5- $^{14}\text{C}$ ]mevalonato. En condiciones estándar, el riñón metaboliza dicho sustrato por esta ruta a una velocidad 50-80 veces mayor que el hígado (Aguilera y col., 1984b). La suplementación de colesterol al 2% en la dieta desde la eclosión, produce un fuerte aumento de la ruta cetogénica en hígado, mientras que en riñón no ejerce prácticamente ningún efecto (Aguilera y col., 1984a).

Sin embargo, cuando se emplea glucosa o acetato como precursores en rumiantes jóvenes, el hígado aparece sólo como un contribuyente minoritario a la síntesis de colesterol, siendo el tejido adiposo e intestino delgado los principales tejidos colesterogénicos (Liepa y col., 1978).

Estos resultados plantean el problema de la posible influencia de la edad y de la especie animal utilizada. En este sentido, y por referencia exclusiva al pollo como animal de experimentación, se ha demostrado que durante su desarrollo embrionario, la incorporación *in vitro* de acetato a lípidos insaponificables es muy superior en cerebro respecto del hígado (Marco y col., 1985), mientras que la incorporación de mevalonato acontece mayoritariamente en hígado (Marco y col., 1986).

A.1.b.2. Efecto del tiempo

En este apartado se ha estudiado la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en función del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato. Los resultados de la Tabla 5 demuestran de nuevo que cualquiera que sea el tiempo considerado entre 15 minutos y 12 horas, la máxima incorporación ocurre en hígado. Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 4, dicho valor máximo se alcanza al cabo de 30 minutos, disminuyendo drásticamente al término de la primera hora tras la inyección.

En el caso de la mucosa intestinal y del cerebro, la incorporación aumenta hasta los 30-60 minutos manteniéndose después prácticamente constante, mientras que en riñón la capacidad incorporativa de acetato parece aumentar durante todo el período de tiempo ensayado.

Cuando se calcula la incorporación a insaponificables totales en el órgano completo (Tabla 6), destaca de nuevo la capacidad acumuladora del hígado, en el cual el valor máximo alcanzado tras los 30 minutos de la inyección representa un 0.53% del acetato suministrado al animal.

A.1.c. Incorporación a las distintas fracciones insaponificables

Se ha estudiado la distribución de la radiactividad del  $[1-^{14}\text{C}]$ acetato incorporado a las distintas fracciones de los lípidos insaponificables, separadas por cromatografía en capa fina. Utilizando los correspondientes patrones, se han identificado escualeno, lanosterol y colesterol. Sin embargo, como se verá a continuación, se han observado en diversas circunstancias otras dos fracciones marcadas -con  $R_f=0.63$  y

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/g tejido)

Tiempo tras la inyección (min)	Hígado	Mucosa duodenal	Riñón	Cerebro
15	2.163 ± 0.333	0.357 ± 0.051	0.122 ± 0.008	0.191 ± 0.025
30	5.818 ± 0.818	0.770 ± 0.107	0.262 ± 0.052	0.375 ± 0.017
60	2.785 ± 0.362	0.832 ± 0.055	0.307 ± 0.046	0.450 ± 0.023
120	2.511 ± 0.337	0.810 ± 0.144	0.372 ± 0.084	0.376 ± 0.016
240	2.379 ± 0.163	0.711 ± 0.191	0.482 ± 0.082	0.406 ± 0.023
720	1.818 ± 0.111	0.670 ± 0.098	0.973 ± 0.053	0.405 ± 0.015

TABLA 5. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre su incorporación a lípidos insaponificables totales por distintos tejidos de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 5 animales.



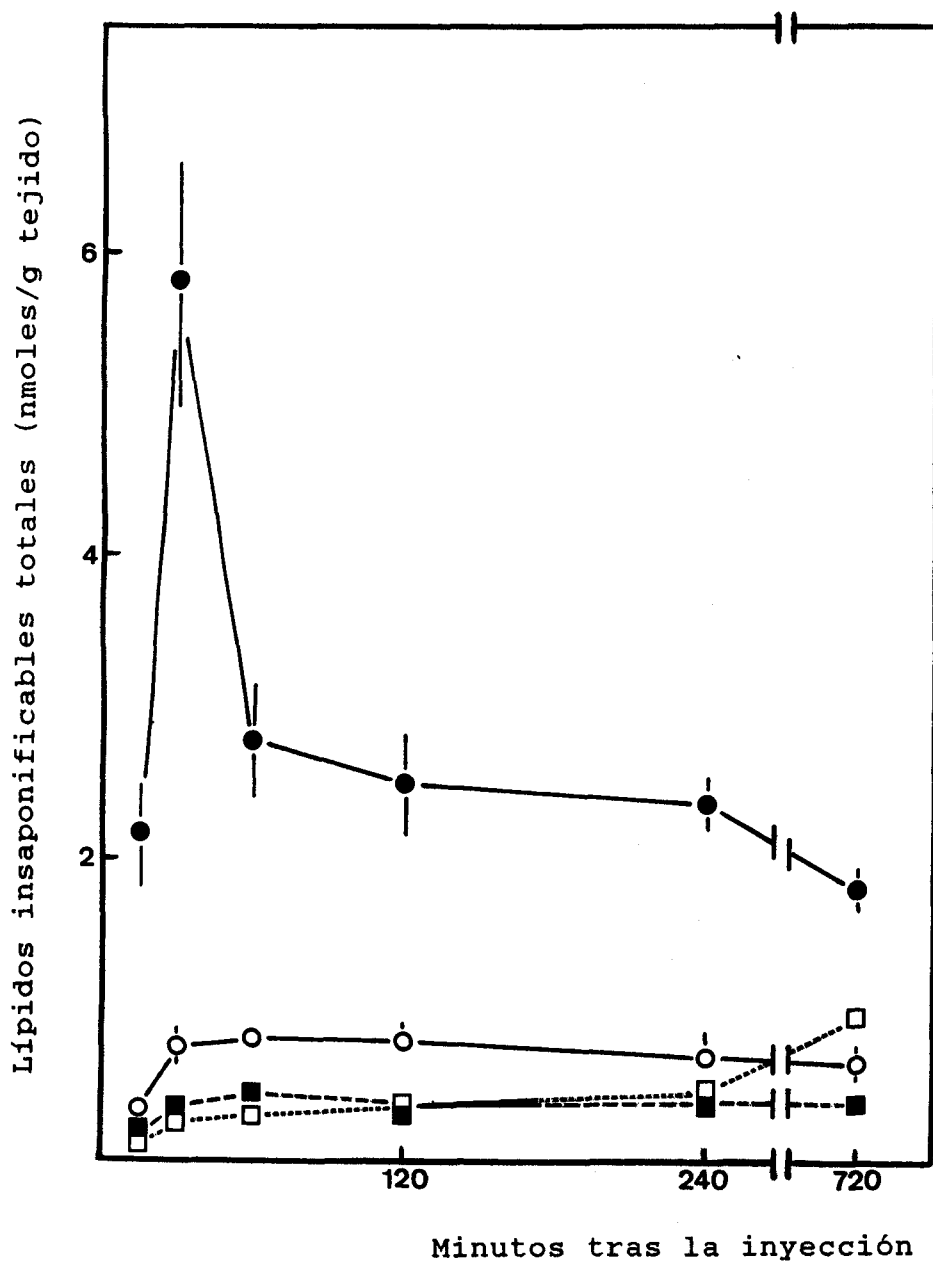


FIGURA 4

Incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4  $\mu$ moles de sustrato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 5 animales. (●)HIGADO, (○)MUCOSA DUODENAL, (□)RIÑON, (■)CEREBRO.

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/órgano completo)

Tiempo tras la inyección (min)	Hígado	Mucosa duodenal	Riñón	Cerebro
15	6.035 ± 0.183	0.241 ± 0.019	0.137 ± 0.001	0.257 ± 0.002
30	18.036 ± 0.448	0.393 ± 0.026	0.277 ± 0.005	0.562 ± 0.002
60	8.959 ± 0.198	0.346 ± 0.016	0.356 ± 0.004	0.616 ± 0.002
120	8.706 ± 0.185	0.470 ± 0.068	0.375 ± 0.008	0.522 ± 0.001
240	7.192 ± 0.089	0.453 ± 0.057	0.535 ± 0.008	0.576 ± 0.002
720	6.419 ± 0.061	0.435 ± 0.012	0.958 ± 0.005	0.533 ± 0.001

TABLA 6. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre su incorporación a lípidos insaponificables totales por distintos órganos completos de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 5 animales.

$R_f < 0.22$ - que también han sido puestas de manifiesto en experiencias *in vitro* tras la incorporación de (R)-[5- $^{14}$ C]mevalonato por distintos tejidos de pollo. Mediante la incorporación de éstas y otras fracciones marcadas por homogenados de hígado y riñón de pollos de distintas edades -en un trabajo simultáneo a la presente Memoria (Aguilera y col., 1987a)-, dichas fracciones se han identificado como óxido(s) de escualeno y derivados del lanosterol respectivamente, si bien a esta última se le ha denominado -por su naturaleza- "insaponificables polares" en el presente trabajo.

#### A.1.c.1. Efecto de la dosis de acetato

El análisis de la incorporación de acetato a los distintos lípidos insaponificables pone de manifiesto que, en general, el colesterol es el principal compuesto sintetizado por los diferentes tejidos de pollo de 15 días de edad, al cabo de 2 horas de inyección del sustrato. Concretamente en el caso del hígado, el colesterol representa más del 95% de los insaponificables formados, independientemente de la dosis de acetato inyectada, apareciendo pequeños porcentajes de insaponificables polares y otros intermediarios biosintéticos (Tabla 7 / Fig. 5).

Sin embargo, tanto en mucosa duodenal (Tabla 8 / Fig. 6) como en riñón (Tabla 9 / Fig. 7), el porcentaje de colesterol observado 2 horas después de la inyección de acetato, incrementa fuertemente a medida que lo hace la concentración de sustrato utilizada, pasando de un 50-60% aproximadamente cuando se inyectan 2  $\mu$ moles a cerca del 100% para 15-20  $\mu$ moles de acetato. En ambos tejidos, el resto de la radiactividad aparece en la fracción de lípidos insaponificables polares, variando en proporción inversa al porcentaje de colesterol y sin que aparezcan en ningún caso proporciones apreciables de cualquier otro intermediario.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
2	--	0.09	0.43	3.18	96.30
4	--	0.54	0.74	2.63	96.09
6	--	0.15	0.14	3.88	95.83
8	0.94	0.42	0.34	0.42	97.88
10	0.13	0.07	0.17	4.12	95.51
15	0.63	0.06	0.36	0.97	97.98
20	0.74	0.16	0.38	0.55	98.17

TABLA 7. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en HIGADO al cabo de 120 minutos de inyección, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

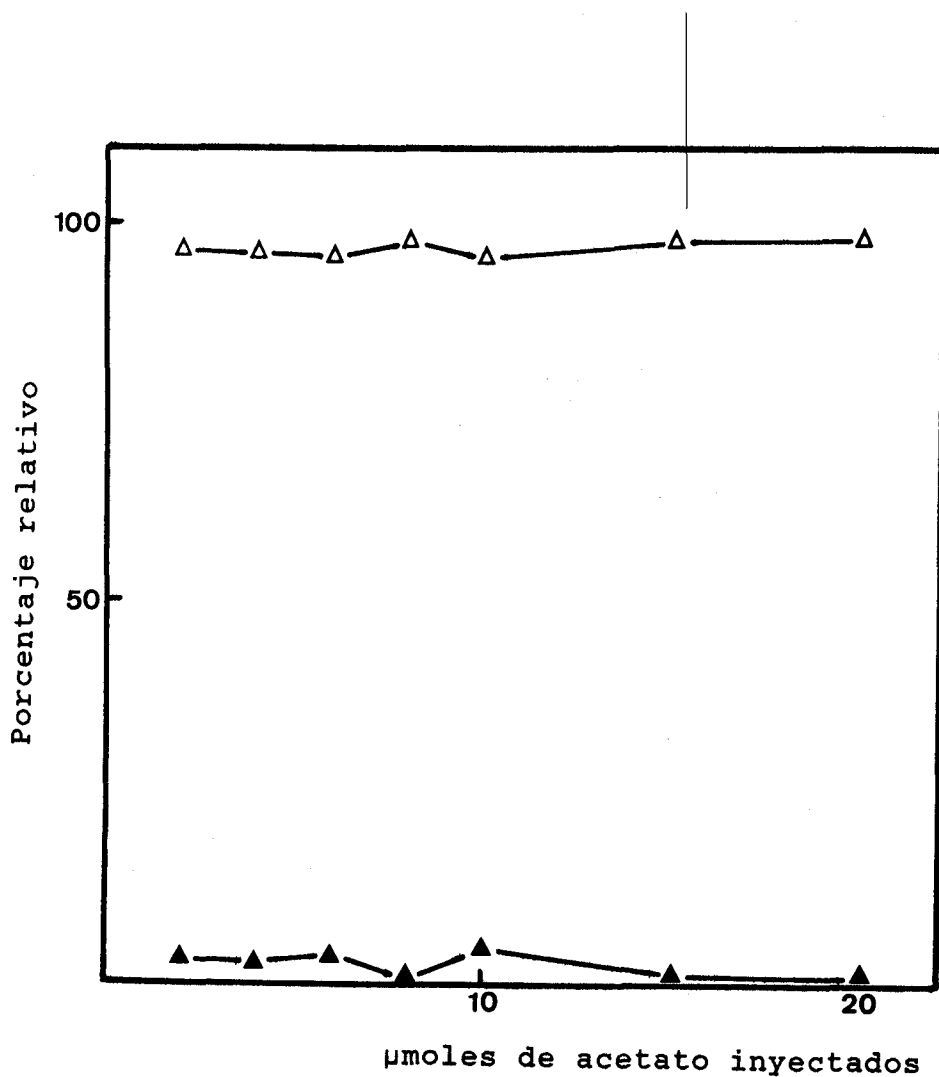


FIGURA 5

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en HIGADO, en función de la concentración de acetato inyectada en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Insaponificables polares	Colesterol
2	51.77	48.23
4	24.87	75.13
6	27.51	72.49
8	19.98	80.02
10	19.16	80.84
15	6.81	93.19
20	1.90	98.10

TABLA 8. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en MUCOSA DUODENAL al cabo de 120 minutos de inyección, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

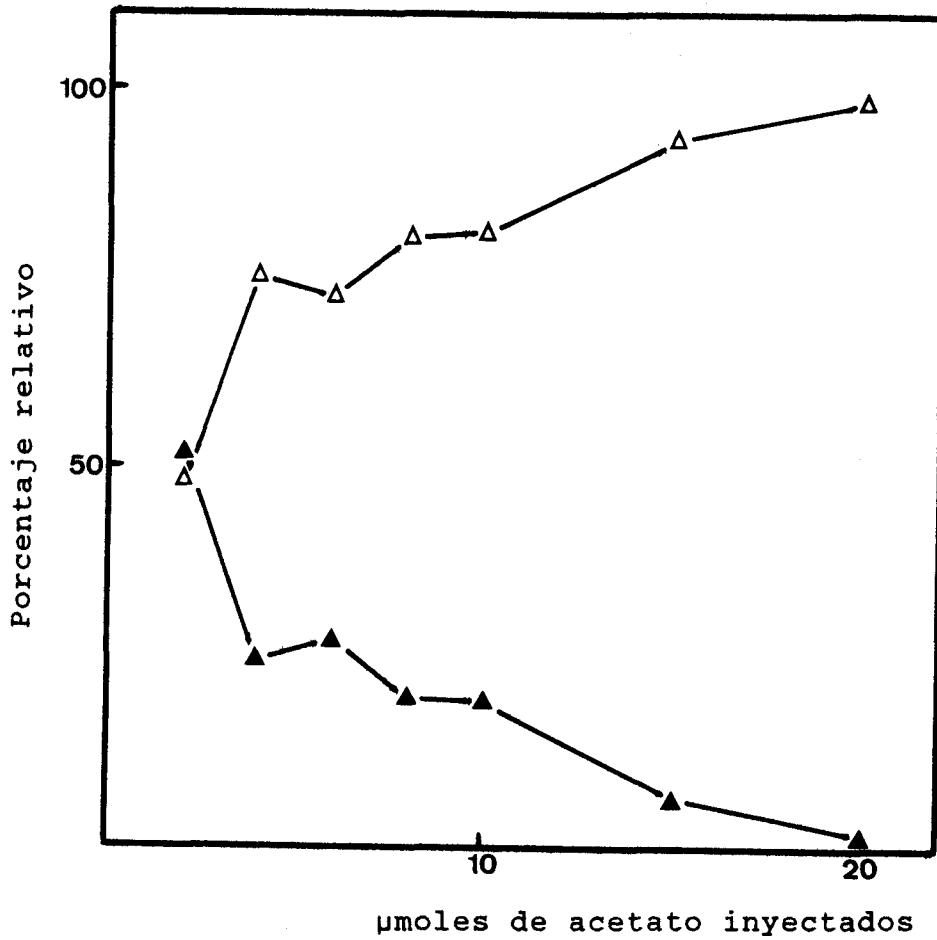


FIGURA 6

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en MUCOSA DUODENAL, en función de la concentración de acetato inyectada en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Insaponificables polares	Colesterol
2	35.01	64.99
4	38.78	61.22
6	33.01	66.99
8	21.91	78.09
10	18.65	81.35
15	4.77	95.23
20	0.88	99.12

TABLA 9. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en RIÑON al cabo de 120 minutos de inyección, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.



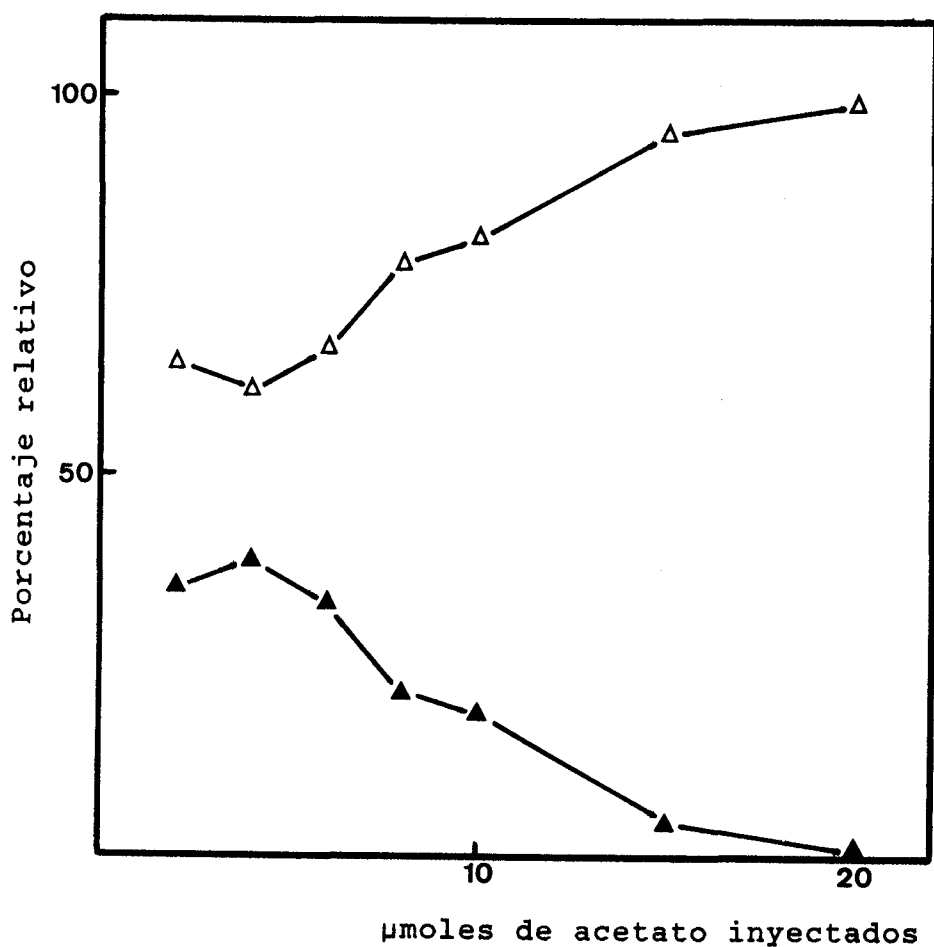


FIGURA 7

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en RIÑON, en función de la concentración de acetato inyectada en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Algo semejante ocurre en el cerebro (Fig. 8), si bien en este caso tienden a observarse pequeñas cantidades de lanosterol en las experiencias realizadas con 15-20  $\mu$ moles de acetato (Tabla 10).

#### A.1.c.2. Efecto del tiempo

La evolución de la incorporación de 4  $\mu$ moles de acetato a las diferentes fracciones de lípidos insaponificables se ha estudiado entre 15 minutos y 12 horas. Tanto en hígado (Tabla 11 / Fig. 9) como en riñón (Tabla 13 / Fig. 11), el acetato es incorporado rápidamente a colesterol, ya que más del 90% de la radiactividad recogida en la fracción insaponificable total se recupera como colesterol al cabo de 15 minutos, manteniéndose en niveles semejantes tras 30-60 minutos y disminuyendo a medida que transcurre el tiempo después de la inyección, a la vez que incrementa el porcentaje de lípidos insaponificables polares. En el caso del hígado y especialmente tras cortos períodos, se observan pequeñas proporciones de lanosterol, escualeno y óxido(s) de escualeno.

La distribución de la radiactividad entre las distintas fracciones insaponificables cambia fuertemente en mucosa duodenal en función del tiempo (Tabla 12). Así, mientras el colesterol representa sólo alrededor del 50% a los 15 minutos, este porcentaje aumenta durante los 30-120 minutos para disminuir de forma drástica tras 12 horas al 25% aproximadamente (Fig. 10). El lanosterol aparece en cantidades apreciables 15 minutos después de la inyección, desapareciendo posteriormente a la vez que se incrementa el porcentaje de lípidos insaponificables polares, que llega a ser del 75% al cabo de 12 horas.

Por último, el cerebro aumenta la formación relativa de colesterol a medida que transcurre el tiempo después de la inyección de acetato, apreciándose cambios inversos en el

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables			
Acetato inyectado ( $\mu$ moles)	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
2	--	49.75	50.25
4	--	53.75	46.25
6	--	33.82	66.18
8	--	12.61	87.39
10	--	21.62	78.38
15	2.84	15.04	82.12
20	5.48	9.08	85.44

TABLA 10. Efecto de la dosis de acetato inyectada sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en CEREBRO al cabo de 120 minutos de inyección, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

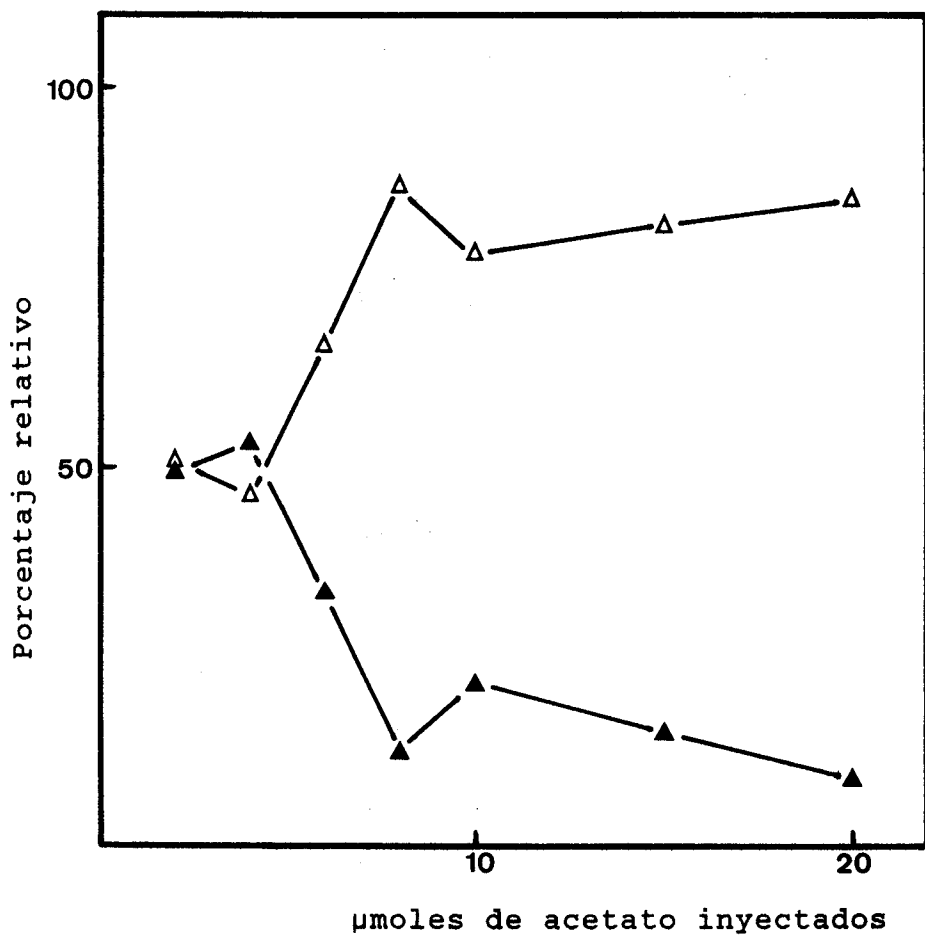


FIGURA 8

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en CEREBRO, en función de la concentración de acetato inyectada en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Tiempo tras la inyección (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables				
	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	2.47	1.48	3.17	1.76	91.12
30	1.67	0.16	1.35	2.86	93.96
60	0.32	0.20	0.52	3.81	95.15
120	0.21	0.20	0.32	8.65	90.62
240	--	0.06	0.29	9.55	90.09
720	--	--	0.24	23.52	75.96

TABLA 11. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en HIGADO, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

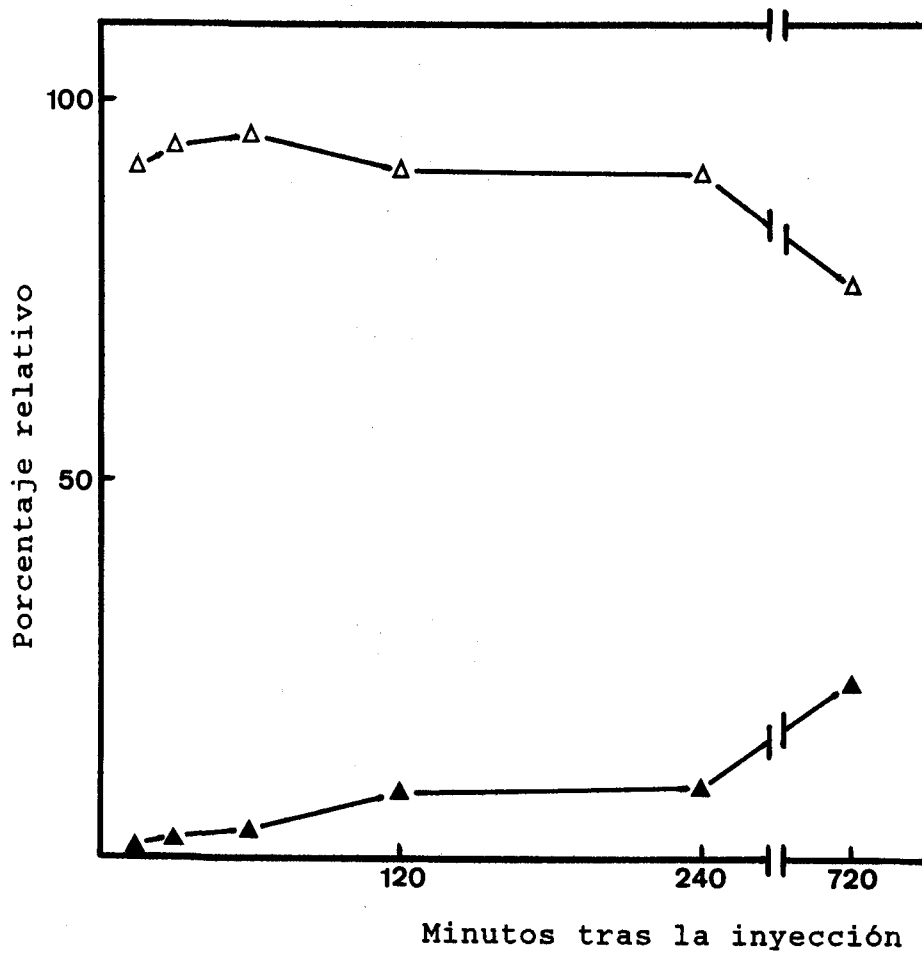


FIGURA 9

Porcentaje de colesterol( $\Delta$ ) y de lípidos insaponificables polares( $\blacktriangle$ ) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en HIGADO, al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Tiempo tras la inyección (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables		
	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	26.23	18.54	55.23
30	15.96	3.98	80.06
60	---	9.99	90.01
120	---	19.26	80.74
240	---	33.88	66.12
720	---	75.90	24.10

TABLA 12. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en MUCOSA DUODENAL, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

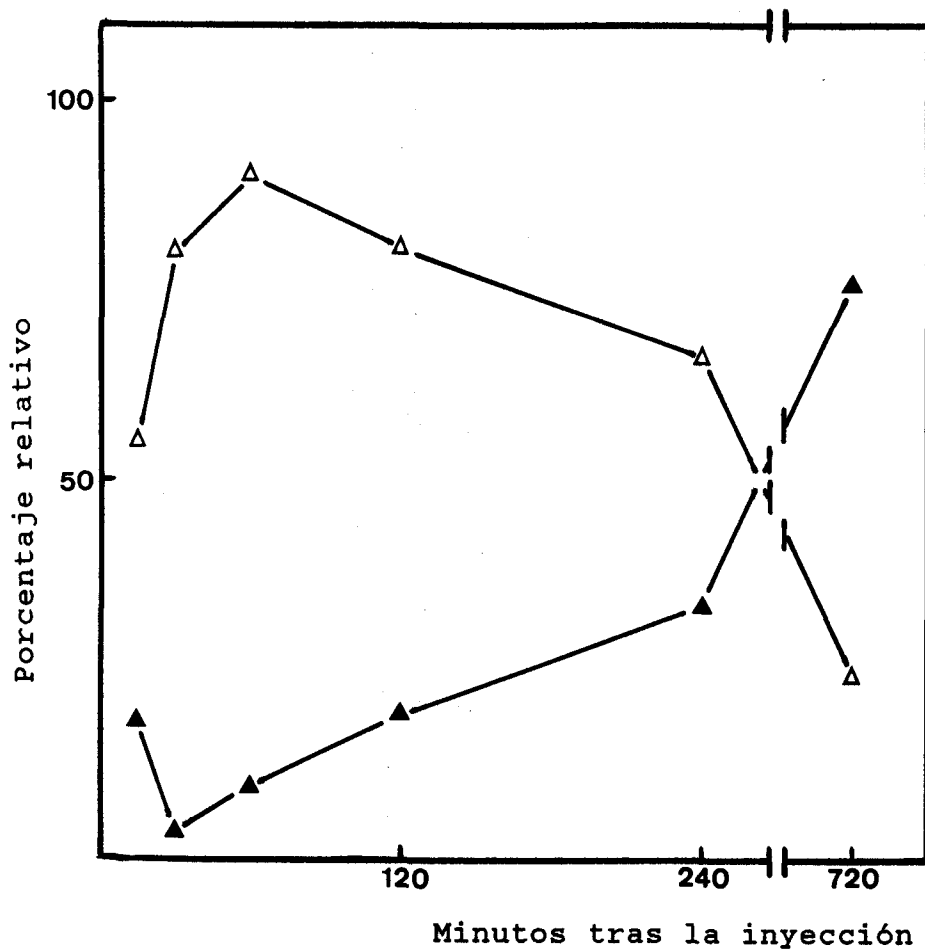


FIGURA 10

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en MUCOSA DUODENAL, al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.



Tiempo tras la inyección (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables	
	Insaponificables polares	Colesterol
15	5.67	94.33
30	10.17	89.83
60	9.85	90.15
120	16.54	83.46
240	18.92	81.08
720	29.01	70.99

TABLA 13. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en RINON, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

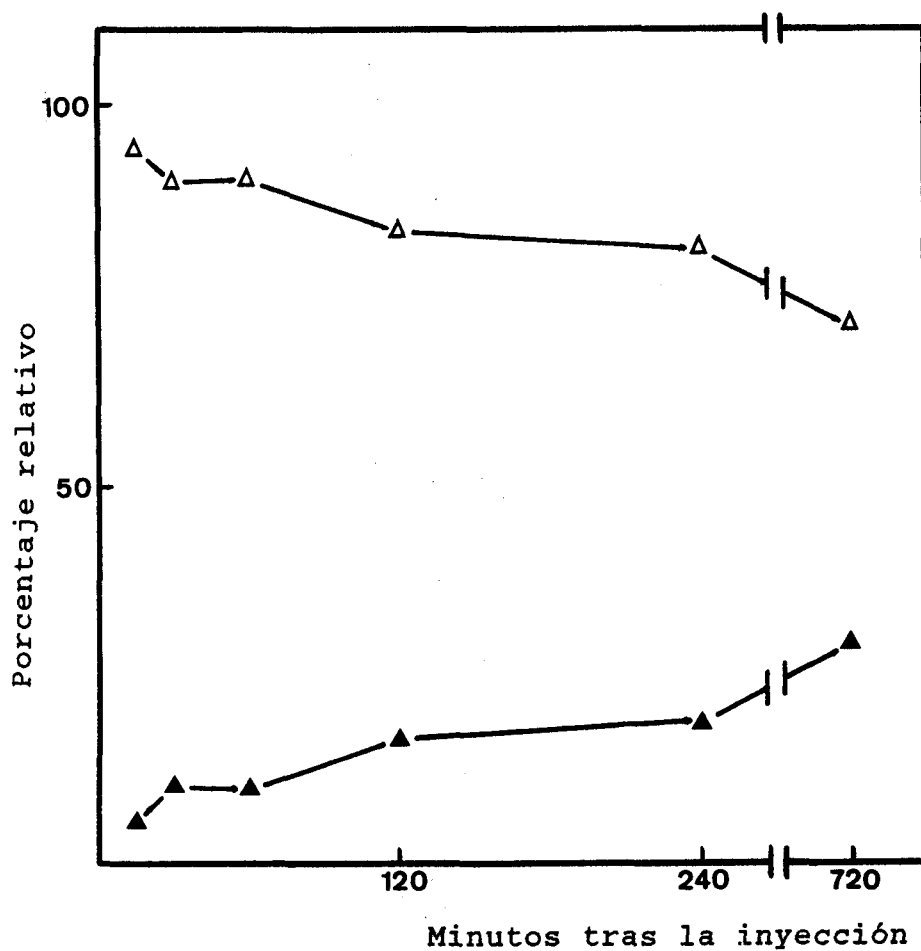


FIGURA 11

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en RIÑON, al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4 μmoles de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

porcentaje de lípidos insaponificables polares (Fig. 12). Sólo para tiempos pequeños -15 a 30 minutos- aparecen proporciones apreciables de lanosterol (Tabla 14).

El conjunto de resultados recogidos en los dos últimos apartados pone claramente de manifiesto que en hígado, el porcentaje de radiactividad correspondiente a la fracción del colesterol es superior al 90% en todas las condiciones ensayadas, salvo después de las 12 horas de inyección que desciende hasta el 75%. Como se discutirá posteriormente, el porcentaje es mucho menor cuando la incorporación de acetato se estudia *in vitro* en cortes de tejido, si bien el colesterol aparece siempre como el principal insaponificable sintetizado por el hígado a partir de acetato.

En la mucosa duodenal, la formación de colesterol se relaciona de una manera inversa a la de los lípidos insaponificables polares, observándose para pequeñas cantidades de acetato un mayor acúmulo de estos intermediarios, lo que parece indicar la no saturación de los sistemas enzimáticos implicados en las últimas etapas de la ruta colesterogénica para concentraciones bajas de sustrato, y por tanto una menor velocidad en la síntesis del colesterol. Asimismo, la observación de lanosterol sólo pocos minutos después de la inyección de acetato puede interpretarse como una cierta lentitud o dificultad de estas últimas etapas biosintéticas en la mucosa intestinal.

Algo semejante parece ocurrir en el cerebro, donde también se acumula lanosterol cuando la incorporación se estudia poco tiempo después -15 a 30 minutos- de la inyección de acetato.

En cuanto al riñón, el colesterol es siempre el principal insaponificable sintetizado a partir de acetato, sin que se observen en ningún caso más intermediarios que los

Tiempo tras la inyección (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables		
	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	18.23	31.57	50.20
30	5.32	29.03	65.65
60	---	24.66	75.34
120	---	15.86	84.14
240	---	19.04	80.96
720	---	9.67	90.33

TABLA 14. Efecto del tiempo transcurrido después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en CEREBRO, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

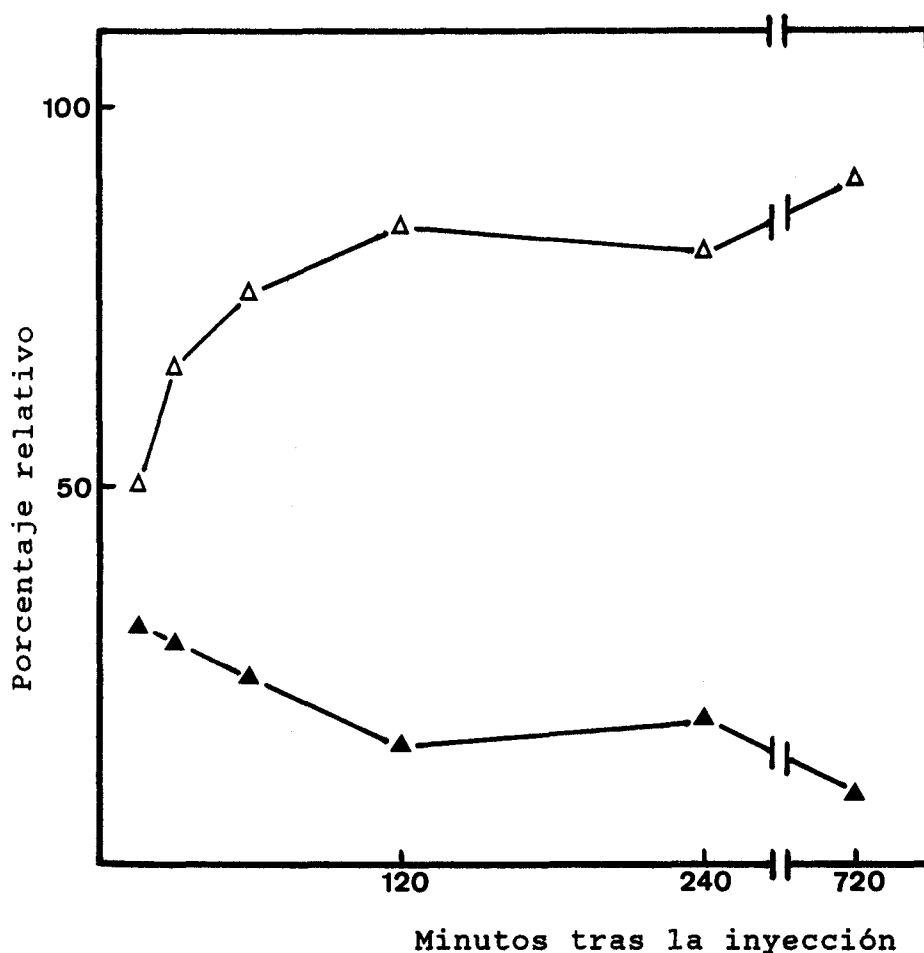


FIGURA 12

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales formados en CEREBRO, al cabo de distintos tiempos tras la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 2 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

insaponificables polares. Estos resultados difieren considerablemente de los encontrados *in vitro* como se verá posteriormente, en cuyo caso el escualeno y el lanosterol aparecen en proporciones considerables. Asimismo, el mevalonato es incorporado principalmente a escualeno por cortes de riñón de pollo (Aguilera y col., 1983). Esta elevada capacidad renal para acumular escualeno a partir de mevalonato, ha sido encontrada también en otras especies animales (Edgren y Hellström, 1972; Hellström y col., 1973).

## A.2. EVOLUCION DIURNA DEL METABOLISMO DEL ACETATO

Se ha descrito en otras especies animales la existencia de variaciones diurnas en la incorporación de acetato a esteroides en diversos órganos, principalmente hígado (Back y col., 1969; Dugan y col., 1972; Edwards y col., 1972; Bortz y Steele, 1973) e intestino (Shefer y col., 1973). Asimismo, parecía existir una cierta controversia sobre la existencia de variaciones semejantes en la incorporación de mevalonato a esteroides (Slakey y col., 1972; Bhat y Ramasarma, 1977; Jabalquinto y Cardemil, 1980) y que aparecían generalmente ligadas a las observadas en la actividad PPMVA descarboxilasa (Bhat y Ramasarma, 1979). Sin embargo, trabajos recientes llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* en este Departamento sobre el metabolismo del (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonato, tanto por la ruta de esteroides como por la ruta cetogénica -cuyos cambios de actividad a lo largo del día no se habían estudiado aún-, pusieron de manifiesto que en hígado y riñón de pollos de 16 días de edad no se aprecia la existencia de un ritmo diurno en el metabolismo del mevalonato por cualquiera de las rutas estudiadas, ni en los valores de actividad PPMVA descarboxilasa (González-Pacanowska y col., 1985).

Por otra parte, también en este Departamento se había demostrado la existencia de variaciones diurnas en la actividad HMG CoA reductasa de hígado e intestino de pollos de 11 días de edad (Ramirez y col., 1984), pero no en la de recién nacidos también en dichos órganos (Ramirez y col., 1982). En los casos en que tal ritmo era observable, las actividades máximas aparecían hacia la mitad del período lumínico, es decir, existía un ritmo invertido respecto al previamente descrito en rata (Kandutsch y Saucier, 1969; Back y col., 1969; Shapiro y Rodwell, 1969; Edwards y Gould, 1974), lo cual está de acuerdo con los distintos hábitos alimenticios de los correspondientes animales.

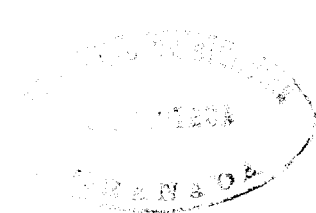
Por todo ello, pareció oportuno efectuar el estudio de

las posibles variaciones a lo largo del día del metabolismo del acetato en pollo, tanto respecto a la producción de CO<sub>2</sub> como a su incorporación a lípidos insaponificables.

A.2.a. Producción de CO<sub>2</sub>

En una primera serie de experiencias, se ha estudiado la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración 30 minutos después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato, sacrificando los animales a las 6.00 y 15.00 h. Este estudio se ha efectuado tanto en pollos recién nacidos como de 15 días de edad. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 15, pudiéndose observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados a ambas horas en pollos recién nacidos, mientras que sí se aprecian tales diferencias en pollos de 15 días.

A la vista de estos resultados, se programaron otras experiencias en las que los animales -de 15 días- se sacrificaron cada 3 horas y en todos los casos 30 minutos después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato. Las cantidades de CO<sub>2</sub> producidas en tales condiciones se presentan en la Tabla 16. Como se puede apreciar, aparecen variaciones estadísticamente significativas entre los valores obtenidos a las 6.00 y 15.00 h, observándose niveles intermedios al resto de las horas ensayadas. La representación gráfica de tales variaciones pone de manifiesto la existencia de un claro ritmo diurno, con un máximo hacia la mitad del período lumínico y un mínimo ligeramente desplazado del punto medio del período de oscuridad (Fig. 13). Tales cambios son aproximadamente paralelos a los que exhibe la producción de calor en la misma especie animal (McLeod y Lewitt, 1984).





CO <sub>2</sub> producido (µmoles/30 minutos)		
Hora del día	Pollos recién nacidos	Pollos de 15 días
06.00	1.347 ± 0.164	0.942 ± 0.104
15.00	1.615 ± 0.075	1.686 ± 0.180*

TABLA 15. Influencia de la hora del día sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración a partir de 4 µmoles de acetato inyectados a pollos recién nacidos y de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 4 animales. \*Diferencia significativa (p<0.01) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas.

Hora del día	CO <sub>2</sub> producido ( $\mu$ moles/30 min)
09.00	1.429 $\pm$ 0.015
12.00	1.452 $\pm$ 0.081
15.00	1.751 $\pm$ 0.186*
18.00	1.409 $\pm$ 0.054
21.00	1.399 $\pm$ 0.005
00.00	1.410 $\pm$ 0.026
03.00	1.227 $\pm$ 0.102
06.00	0.867 $\pm$ 0.098

TABLA 16. Influencia de la hora del día sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración, a partir de 4  $\mu$ moles de acetato inyectados a pollos de 15 días de edad en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 animales. \*Diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas.

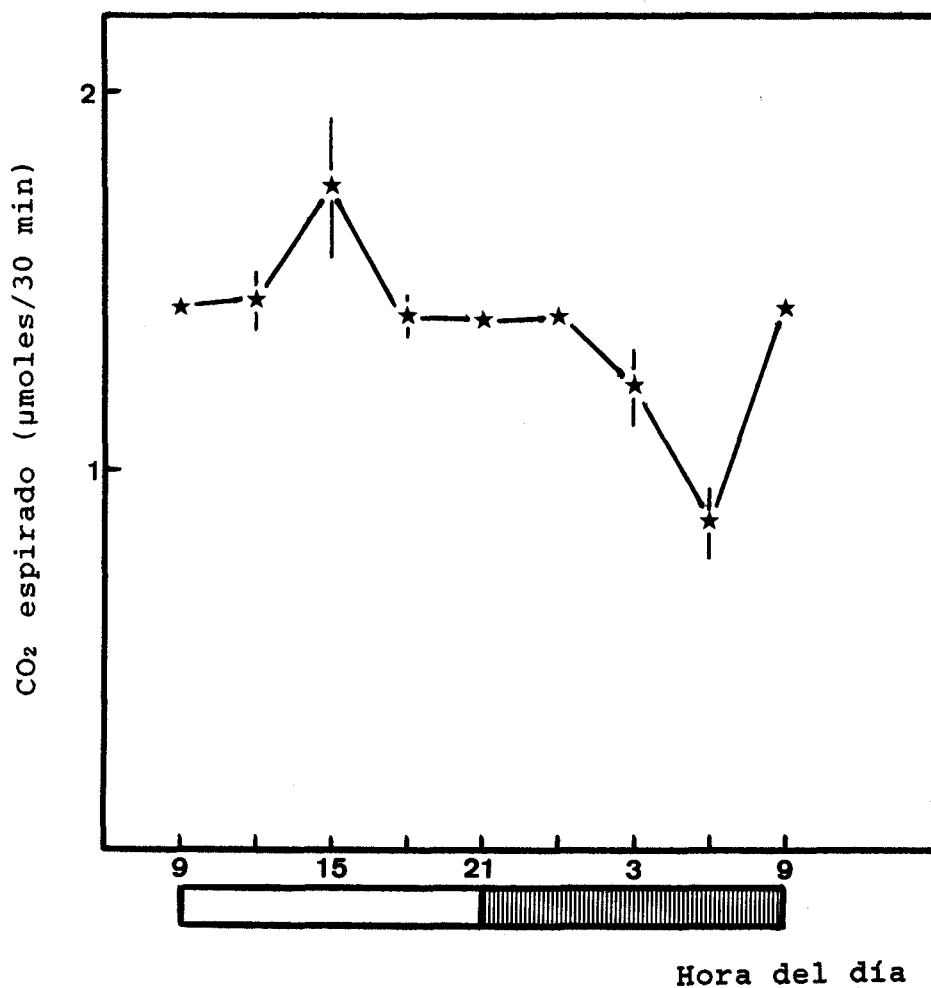


FIGURA 13

Evolución diurna de la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración después de 30 minutos de la inyección de 4 µmoles de acetato a pollos de 15 días, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 animales.

A.2.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales

De un modo semejante a lo descrito en el apartado anterior, se ha estudiado la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en hígado y mucosa duodenal de pollos recién nacidos y de 15 días, sacrificados a las 6.00 y 15.00 h en los 30 minutos siguientes a la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato. Como se pone de manifiesto en la Tabla 17, no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos a ambas horas ni en hígado ni en mucosa duodenal de pollos recién nacidos, mientras que en los de 15 días sí aparece una capacidad de incorporación significativamente superior a las 15.00 h en ambos tejidos.

De acuerdo con estos resultados, se ha estudiado la incorporación de acetato por distintos tejidos de pollos de 15 días, sacrificando los animales cada 3 horas y en todos los casos, 30 minutos después de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato. Como se observa en la Tabla 18, ni en riñón ni en cerebro existen diferencias significativas a las distintas horas ensayadas, mientras que en hígado y mucosa duodenal aparecen valores máximos a las 15.00 h, apreciándose asimismo en el caso del hígado un mínimo a las 6.00 h y sólo pequeños cambios en mucosa duodenal (Fig. 14)

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Ramirez y col.(1982) sobre la evolución diurna de la actividad HMG CoA reductasa de pollos de 9 días. A esta edad, cuando ya se han estabilizado los hábitos alimentarios de los animales, la actividad reductasa hepática presenta un máximo a las 15.00 h y un mínimo sobre las 3.00 h. Como puede comprobarse por tanto, y a pesar de la enorme variabilidad de los datos obtenidos en la producción de insaponificables por el hígado, ésta presenta un gran paralelismo con la evolución de la actividad reductasa.

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/30 min/g tejido)

Hora del día	Pollos recién nacidos		Pollos de 15 días	
	Hígado	Mucosa duodenal	Hígado	Mucosa duodenal
06.00	2.706 ± 0.367	2.150 ± 0.610	1.957 ± 0.525	0.356 ± 0.064
15.00	2.503 ± 0.476	2.256 ± 0.562	4.842 ± 0.314 <sup>a</sup>	1.347 ± 0.248 <sup>b</sup>

TABLA 17. Influencia de la hora del día sobre la incorporación de 4  $\mu$ moles de acetato a lípidos insaponificables totales por HIGADO y MUCOSA DUODENAL de pollos recién nacidos y de 15 días, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 4 animales. <sup>a</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas. <sup>b</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas.

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/30 min/g tejido)

Hora del día	Hígado	Mucosa duodenal	Riñón	Cerebro
09.00	2.350 ± 0.596	0.227 ± 0.001	0.135 ± 0.005	0.340 ± 0.051
12.00	3.697 ± 0.320	0.138 ± 0.020	0.120 ± 0.008	0.264 ± 0.050
15.00	4.728 ± 0.189 <sup>a</sup>	1.011 ± 0.153 <sup>b</sup>	0.141 ± 0.002	0.298 ± 0.022
18.00	3.143 ± 0.600	0.250 ± 0.066	0.168 ± 0.038	0.198 ± 0.025
21.00	2.805 ± 0.108	0.249 ± 0.057	0.170 ± 0.025	0.268 ± 0.037
00.00	2.208 ± 0.049	0.267 ± 0.075	0.165 ± 0.010	0.220 ± 0.050
03.00	2.052 ± 0.331	0.296 ± 0.040	0.150 ± 0.045	0.245 ± 0.035
06.00	1.665 ± 0.192	0.283 ± 0.057	0.149 ± 0.012	0.251 ± 0.003

TABLA 18. Influencia de la hora del día sobre la incorporación de 4  $\mu$ moles de acetato a lípidos insaponificables totales por HIGADO, MUCOSA DUODENAL, RIÑON y CEREBRO de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 animales. <sup>a</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas. <sup>b</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) respecto del valor obtenido a las 06.00 horas.

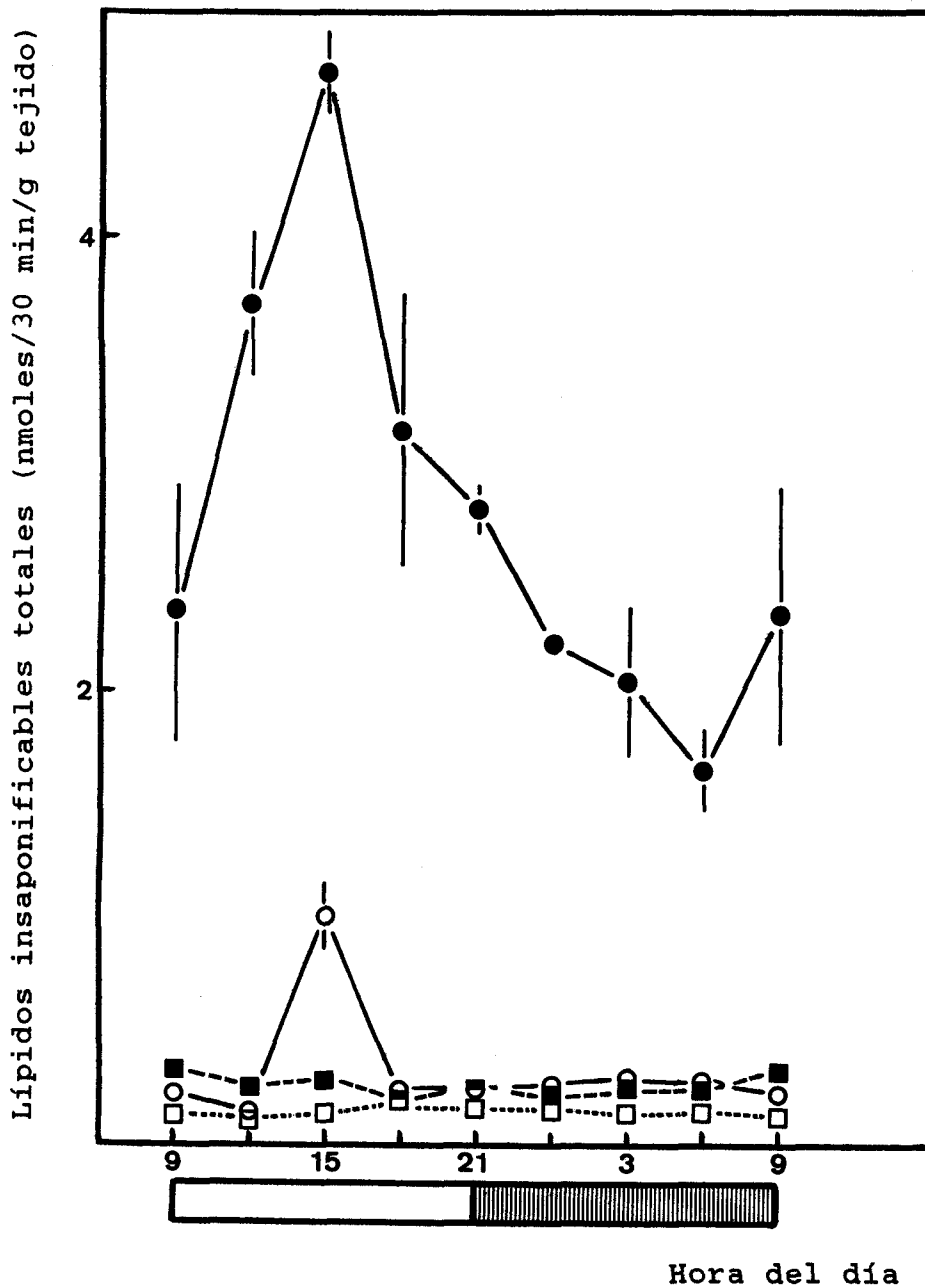


FIGURA 14

Evolución diurna de la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales por HIGADO(●), MUCOSA DUODENAL(○), RIÑON(□) y CEREBRO(■) de pollos de 15 días de edad, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 animales.

En cuanto a la incorporación por la mucosa duodenal, también se aprecia a las 15.00 h un máximo -aunque no tan acusado- que coincide con el de la actividad reductasa en dicho tejido, mientras que no aparece el mínimo previsible a mitad del período de oscuridad. Algo semejante ocurre con la reductasa, pudiendo explicarse este hecho por la existencia de restos de alimento en la molleja del pollo y su posible consumo durante la oscuridad, lo cual determina que la mucosa duodenal experimente un aporte casi continuo de alimento aunque el animal no lo ingiera durante dicho período y, por lo tanto, ni la incorporación de acetato a lípidos insaponificables ni la actividad reductasa presentan variaciones significativas durante la etapa oscura.

Como ya se expuso anteriormente, la capacidad de incorporación de acetato a insaponificables totales en riñón y cerebro no presenta cambios significativos respecto a la hora del día considerada, comportándose de nuevo de un modo prácticamente similar a la actividad HMG CoA reductasa.

Un último aspecto merece la pena discutir en este apartado. La incorporación de acetato por la mucosa duodenal -expresada en nmoles/ 30 minutos/ g tejido- es inferior en pollos de 15 días respecto de la existente en recién nacidos, tanto a las 6.00 h como a las 15.00 h. Una vez más, existe un estrecho paralelismo entre la síntesis de insaponificables totales y la HMG CoA reductasa, ya que la actividad específica de esta enzima tiende a disminuir en dicho tejido del pollo a partir de la primera semana tras la eclosión (Alejandre y col., 1981).



A.2.c. Incorporación a las distintas fracciones de insaponificables

Al igual que en experiencias anteriores, se ha determinado la evolución diurna de los porcentajes de radiactividad del acetato incorporado a las distintas fracciones insaponificables en los cuatro tejidos estudiados. Como se puede apreciar en la Tabla 19, y a cualquier hora que se considere, el colesterol es -con diferencia- el principal insaponificable sintetizado en el hígado, si bien tienden a apreciarse ligeras variaciones a lo largo del día -especialmente un mínimo a las 6.00 h que coincide con el encontrado para los totales producidos en dicho órgano- tal y como se observa en la Fig. 15 . A todas las horas estudiadas aparecen pequeños porcentajes de escualeno, óxido(s) de escualeno y lanosterol, con valores muy bajos y sin variaciones diurnas acusadas, por lo que no se han representado en dicha Fig. 15 . Sin embargo, el porcentaje de insaponificables polares -aunque no es extremadamente elevado- sí presenta variaciones a lo largo del día, que de nuevo se muestran inversas a las del colesterol, con un máximo a las 6.00 h.

Los resultados obtenidos en mucosa duodenal parecen ser sumamente interesantes, ya que los porcentajes de colesterol y de lípidos insaponificables polares -las dos únicas fracciones observadas- experimentan profundas e inversas variaciones a lo largo del día (Tabla 20), con un máximo muy acusado del colesterol en la fase luminosa (más del 90%) -coincidiendo así con el máximo de insaponificables totales-, mientras que en la fase oscura ambos porcentajes tienden a igualarse (Fig. 16).

Variaciones similares se observan en riñón (Tabla 21), aunque en este órgano las fluctuaciones son más acusadas pues el porcentaje de colesterol disminuye hasta el 15-20% en la fase oscura, aumentando sensiblemente en ésta la proporción de insaponificables polares (Fig. 17).

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Hora del día	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
09.00	--	0.78	0.97	8.42	89.83
12.00	1.11	0.94	2.46	5.27	90.22
15.00	1.50	0.31	1.08	4.09	93.02
18.00	1.28	0.20	1.95	7.25	89.32
21.00	1.51	0.89	1.16	8.55	87.89
00.00	1.45	1.21	1.18	9.49	86.67
03.00	0.53	3.20	1.76	12.51	82.00
06.00	--	1.17	1.08	20.39	77.36

TABLA 19. Influencia de la hora del día sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en HIGADO después de 30 minutos de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 3 experiencias. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

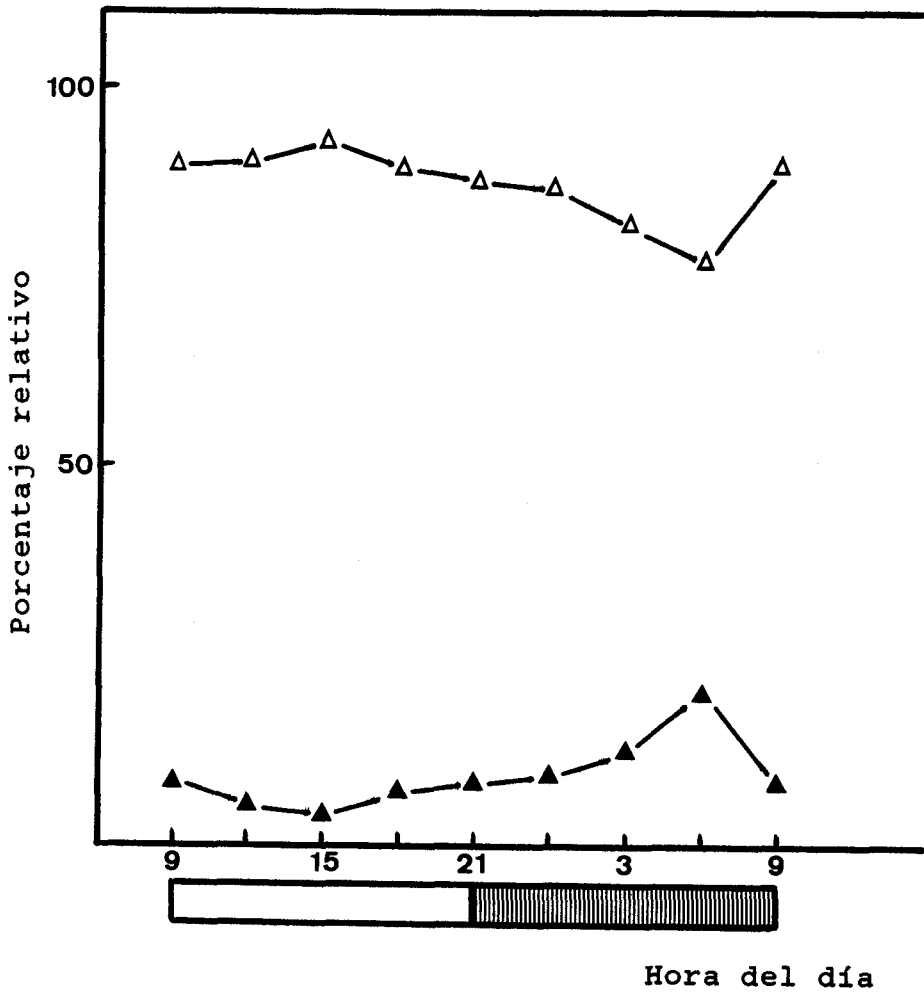


FIGURA 15

Evolución diurna del porcentaje de colesterol( $\Delta$ ) y de lípidos insaponificables polares( $\blacktriangle$ ) formados en HIGADO en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Hora del día	Insaponificables polares	Colesterol
09.00	8.47	91.53
12.00	2.26	97.74
15.00	7.67	92.33
18.00	28.82	71.18
21.00	56.69	43.31
00.00	54.83	45.17
03.00	53.85	46.15
06.00	48.69	51.31

TABLA 20. Influencia de la hora del día sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en MUCOSA DUODENAL después de 30 minutos de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 3 experiencias. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

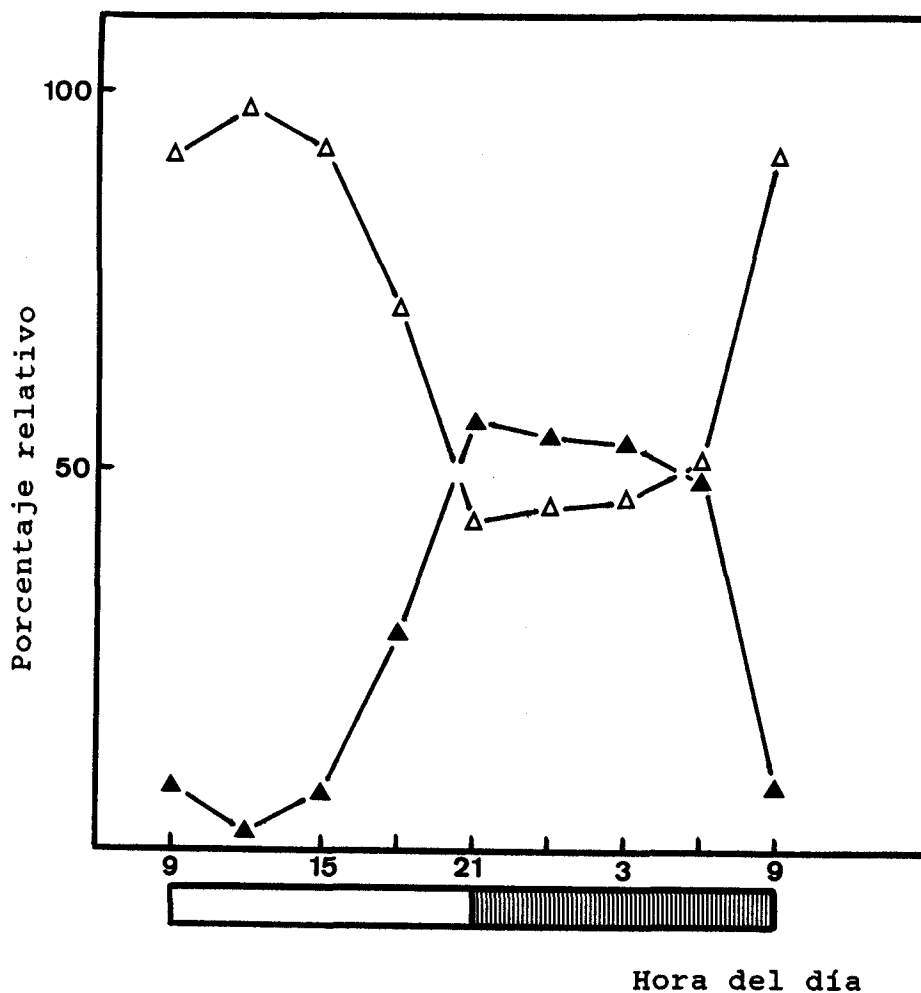


FIGURA 16

Evolución diurna del porcentaje de colesterol( $\Delta$ ) y de lípidos insaponificables polares( $\blacktriangle$ ) formados en MUCOSA DUODENAL en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Hora del día	Insaponificables polares	Colesterol
09.00	29.14	70.86
12.00	34.96	65.04
15.00	40.86	59.14
18.00	78.26	21.74
21.00	VND	VND
00.00	83.51	16.49
03.00	73.95	26.05
06.00	62.67	37.33

TABLA 21. Influencia de la hora del día sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en RIÑON después de 30 minutos de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de 3 experiencias. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%. VND= valores no disponibles.

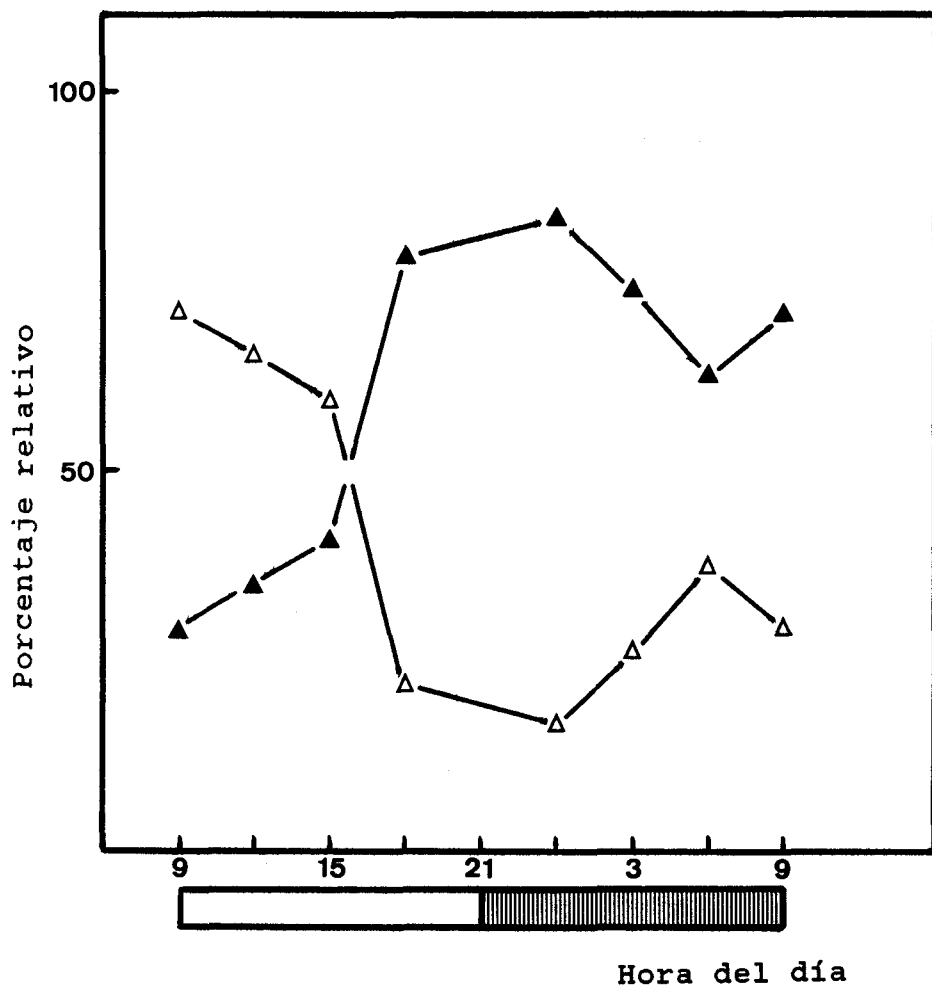


FIGURA 17

Evolución diurna del porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) formados en RIÑON en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias.

Por último, en el caso del cerebro (Tabla 22) no aparecen diferencias claramente significativas entre los valores obtenidos a las distintas horas del día, observándose en todas ellas un 65-80% de colesterol y valores muy inferiores de insaponificables polares, siendo aún menores los de lanosterol (no representados en la Fig. 18).

Aunque, en general, las variaciones en el porcentaje de colesterol sintetizado coinciden con las observadas en los lípidos insaponificables totales, es de destacar el comportamiento del riñón, donde la fracción de insaponificables polares aparece en mayor proporción al principio de la fase oscura y el porcentaje de colesterol experimenta una simultánea disminución, a pesar de que los insaponificables totales, en conjunto, no experimentan cambios apreciables a lo largo del día. Estos resultados parecen sugerir la existencia de ritmo diurno en algunas de las enzimas implicadas en las últimas etapas de la colesterogénesis, concretamente entre los derivados del lanosterol -denominados hasta ahora insaponificables polares- y el colesterol. Sin embargo, dicho acúmulo de los insaponificables polares no parece afectar a las enzimas anteriores, ya que la cantidad de acetato incorporado a insaponificables totales no disminuye sensiblemente en estas condiciones.

Consideraciones semejantes podrían hacerse para la mucosa duodenal, si bien el acúmulo de derivados del lanosterol no es tan importante como en el caso del riñón.



Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Hora del día	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
09.00	6.71	26.54	66.75
12.00	9.55	12.93	77.52
15.00	7.14	15.48	77.38
18.00	1.30	29.48	69.22
21.00	4.96	18.70	76.34
00.00	7.62	13.79	78.59
03.00	5.26	21.58	73.16
06.00	6.49	24.70	68.81

TABLA 22. Influencia de la hora del día sobre el porcentaje de las diferentes fracciones de lípidos insaponificables formados en CEREBRO después de 30 minutos de la inyección de 4  $\mu$ moles de acetato, en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

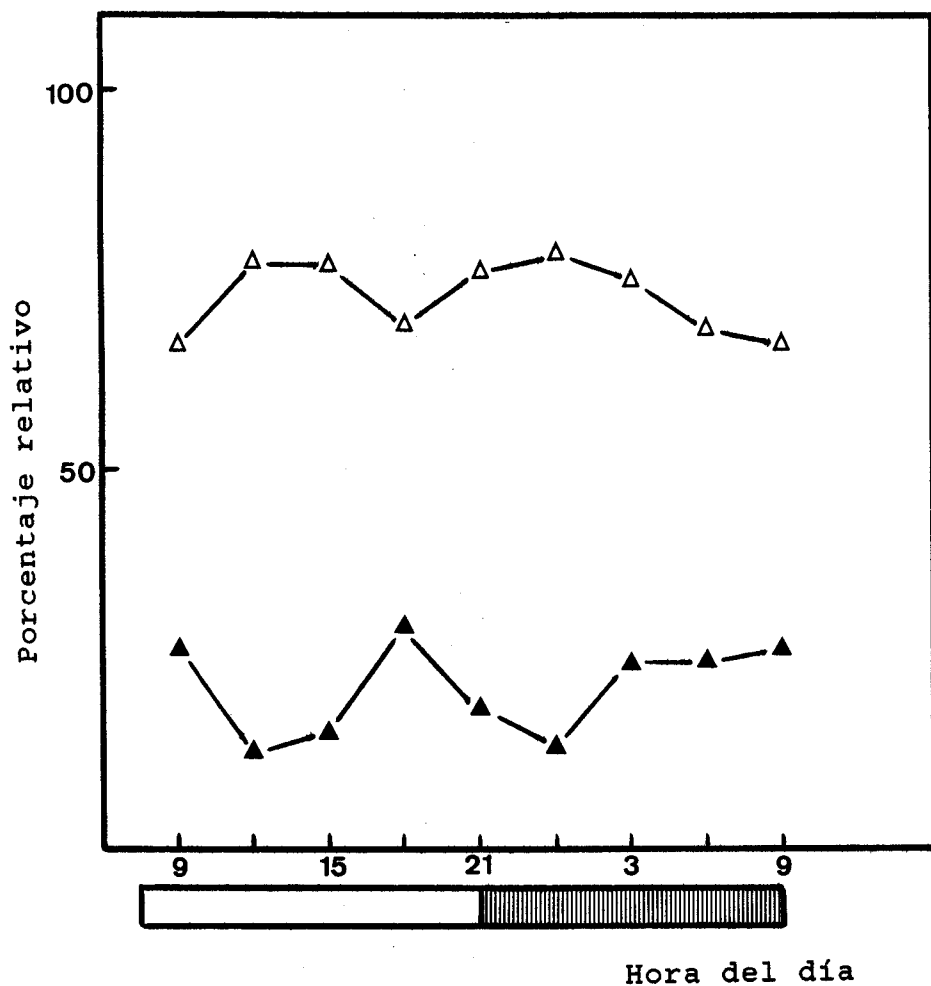


FIGURA 18

Evolución diurna del porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) formados en CEREBRO en condiciones *in vivo*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias.

A.3. CONTRIBUCION RELATIVA DE LOS DIFERENTES TEJIDOS AL METABOLISMO DEL ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES TOTALES

Teniendo en cuenta el diferente comportamiento de los cuatro tejidos estudiados hasta el momento, en relación al metabolismo del acetato, se creyó oportuno ampliar este estudio a otra serie de tejidos de pollo. Para ello, se determinó su capacidad relativa de incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales, seleccionando las siguientes condiciones *in vivo*: inyección de 4  $\mu$ moles de acetato a pollos de 15 días de edad, sacrificándolos a las 9.00 h, después de 30 minutos de dicha inyección. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 23, donde puede apreciarse claramente que los testículos presentan la mayor capacidad para sintetizar insaponificables cuando ésta se representa por gramo de tejido, obteniéndose valores ligeramente superiores a los del hígado y muy por encima de los correspondientes al páncreas, la médula espinal, la mucosa duodenal y todos los demás tejidos ensayados.

La elevada actividad biosintética de los testículos contrasta con la que presentan cuando se utiliza mevalonato como sustrato, en cuyo caso dicha actividad es inferior a la del hígado, mucosa duodenal y músculo liso (Aguilera, 1985 Tesis Doctoral). Asimismo, es de destacar de nuevo la baja capacidad del riñón para incorporar acetato, siendo un órgano mayoritariamente responsable del metabolismo del mevalonato. Los pequeños niveles de lípidos insaponificables sintetizados por el corazón y la piel a partir de acetato, coinciden con los obtenidos a partir de mevalonato. En cualquier caso, el desprendimiento medio de CO<sub>2</sub> en la respiración, procedente de la degradación oxidativa del acetato en las mismas condiciones, fue muy superior a la incorporación a insaponificables :

CO<sub>2</sub> producido = 935.92  $\pm$  75.05 nmoles/30 minutos (n=14)

De acuerdo con el peso del tejido estudiado, la cantidad

Tejido	Número de experiencias	Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales	
		(nmoles/30 min/g tejido)	(nmoles/30 min/órgano completo)
HIGADO	12	5.082 ± 0.558	17.746 ± 1.964
MUCOSA DUODENAL	11	0.728 ± 0.093	0.441 ± 0.030
RIÑON	11	0.344 ± 0.024	0.437 ± 0.022
CEREBRO	12	0.625 ± 0.040	0.894 ± 0.067
MEDULA ESPINAL	5	1.330 ± 0.041	0.282 ± 0.011
ADIPOSO	6	0.451 ± 0.080	---
PANCREAS	5	1.528 ± 0.108	1.027 ± 0.030
PULMONES	5	0.365 ± 0.026	0.181 ± 0.009
PIEL	6	0.176 ± 0.009	---
MUSCULO LISO	6	0.864 ± 0.114	---
TESTICULO	5	5.784 ± 1.330	0.347 ± 0.104
CORAZON	6	0.121 ± 0.012	0.087 ± 0.009

TABLA 23. Contribución de diferentes tejidos de pollos de 15 días a la incorporación de 4  $\mu$ moles de acetato a lípidos insaponificables totales, en condiciones *in vivo*.

de lípidos insaponificables totales sintetizada por el hígado completo es muy superior a la encontrada en el resto de los casos (Tabla 23), lo cual corrobora una vez más la importancia de dicho órgano en el proceso en estudio.

B. EXPERIENCIAS *IN VITRO*



B.1. ESTUDIO DETALLADO DEL METABOLISMO DEL ACETATO EN CORTES DE HIGADO Y RIÑÓN Y EN RASPADO DE MUCOSA DUODENAL

Teniendo en cuenta las diferencias descritas en la bibliografía para la contribución de los diferentes tejidos al metabolismo del mevalonato, según que las experiencias se realicen *in vivo* o *in vitro* en rata (Edmond y Popjak, 1974; Righetti y col., 1976), así como las puestas de manifiesto en pollo (Aguilera y col., 1982; Linares y col., 1983), se estimó oportuno emprender el estudio *in vitro* del metabolismo del acetato con objeto de poder establecer las comparaciones pertinentes con los resultados obtenidos en condiciones *in vivo*. Para ello se utilizaron cortes delgados de hígado y de riñón, así como raspado de mucosa duodenal, dada la dificultad manifiesta para obtener cortes homogéneos de este tejido. El método empleado se basó en el de Righetti y col. (1976) para estudios *in vitro* del metabolismo del mevalonato, con las modificaciones ya reseñadas en el apartado de Material y Métodos.

B.1.a. Producción de CO<sub>2</sub>

Al igual que en las experiencias *in vivo*, se ha determinado la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato, utilizando en este caso los cortes de hígado y riñón así como el raspado de mucosa duodenal, estudiando el efecto no sólo de la concentración de sustrato y del tiempo de reacción, sino también la influencia de la cantidad de tejido utilizado.

B.1.a.1. Efecto del peso de tejido

Las experiencias iniciales se desarrollaron en orden a conocer la posible proporcionalidad entre la cantidad de CO<sub>2</sub>



producido y el peso de tejido empleado, utilizando una concentración de acetato 3 mM y prolongando la reacción durante 60 minutos. Como puede apreciarse en la Tabla 24, la producción de CO<sub>2</sub> es proporcional respecto al peso de tejido hasta los 100 miligramos en el caso del riñón, y hasta los 150 miligramos en el hígado y la mucosa duodenal (Fig. 19).

Por otra parte, y para cualquiera de los pesos utilizados, la producción de CO<sub>2</sub> es mayor en riñón, seguido por el hígado y la mucosa duodenal.

#### B.1.a.2. Efecto de la concentración de acetato

Utilizando cantidades de tejido comprendidas dentro de los límites de proporcionalidad antes indicados, se ha estudiado la producción de CO<sub>2</sub> en función de la concentración de acetato (1-12 mM). De nuevo el riñón muestra mayor capacidad de producción de CO<sub>2</sub> (Tabla 25), sin que tienda a alcanzarse un nivel constante de la misma para ninguna de las concentraciones de sustrato ensayadas (Fig. 20).

Sin embargo, en el caso del hígado y de la mucosa duodenal si que parece estabilizarse la producción de CO<sub>2</sub> frente a elevadas concentraciones de acetato (8-12 mM).

De acuerdo con estos resultados, normalmente se utilizó una concentración 3 mM de acetato en todas las experiencias *in vitro*.

#### B.1.a.3. Efecto del tiempo de incubación

Se ha estudiado la producción de CO<sub>2</sub> por cortes de hígado y de riñón, así como por raspado de mucosa duodenal, en reacciones llevadas a cabo *in vitro* entre 15 y 120 minutos (Tabla 26). Como en casos anteriores, el riñón presenta la máxima

Peso de tejido (mg)	CO <sub>2</sub> producido ( $\mu$ moles/h)		
	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
50	0.32 $\pm$ 0.04	1.58 $\pm$ 0.25	0.19 $\pm$ 0.01
100	0.62 $\pm$ 0.07	2.80 $\pm$ 0.21	0.30 $\pm$ 0.01
150	1.01 $\pm$ 0.21	2.66 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.02
200	1.14 $\pm$ 0.16	2.85 $\pm$ 0.17	0.42 $\pm$ 0.01

TABLA 24. Efecto del peso de tejido sobre la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato 3 mM, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

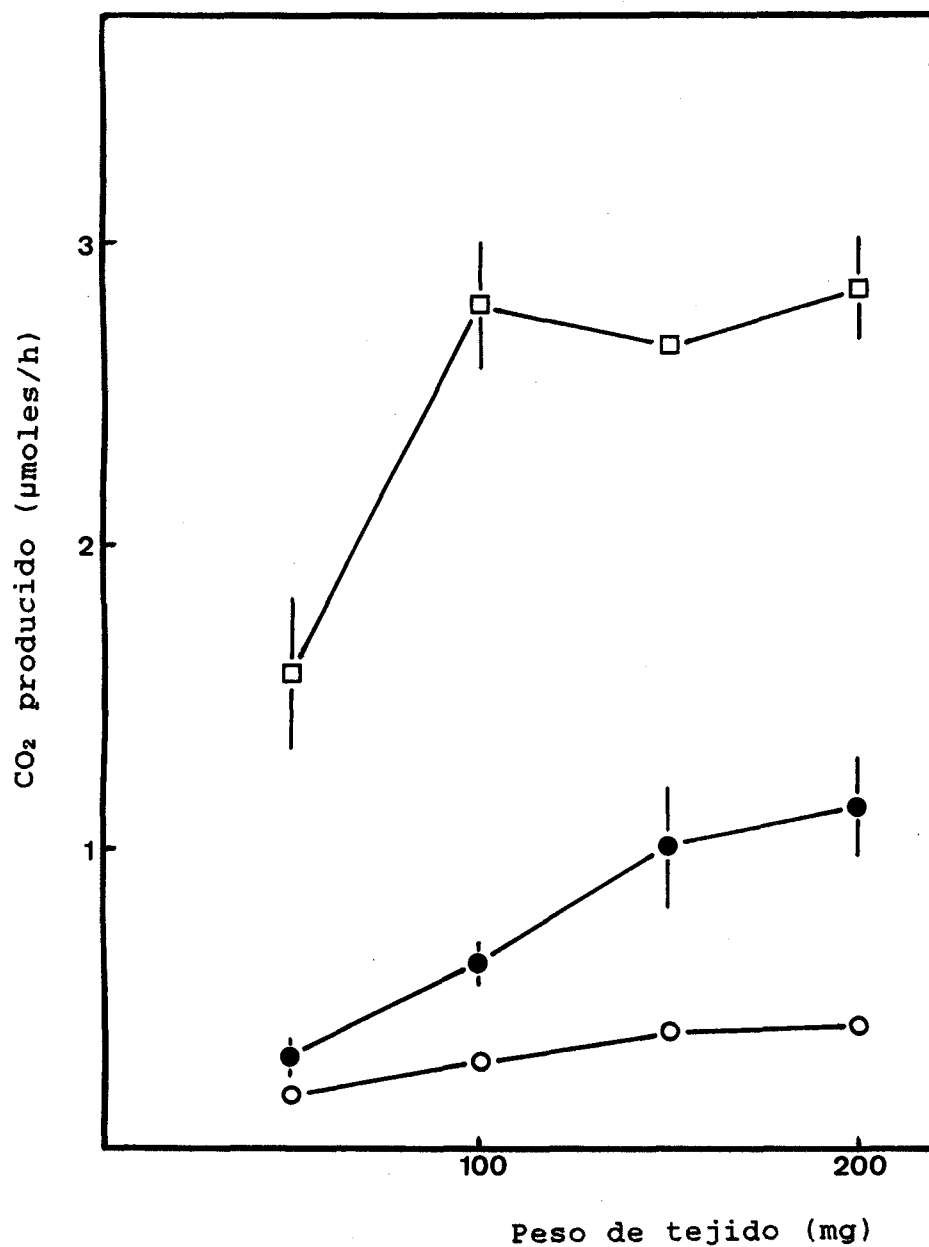


FIGURA 19

Producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato 3 mM por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑON(□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función del peso de tejido utilizado en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

Concentración de acetato (mM)	CO <sub>2</sub> producido (μmoles/h/g tejido)		
	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
1	2.20 ± 0.13	7.61 ± 0.59	1.30 ± 0.08
2	6.14 ± 0.72	13.40 ± 0.37	1.93 ± 0.05
3	6.77 ± 0.53	20.64 ± 1.18	2.49 ± 0.16
4	8.85 ± 0.69	27.48 ± 1.19	2.54 ± 0.02
8	13.51 ± 1.61	48.96 ± 2.64	2.94 ± 0.17
12	15.34 ± 1.00	59.32 ± 3.09	3.94 ± 0.08

TABLA 25. Efecto de la concentración de acetato sobre la producción de CO<sub>2</sub> en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

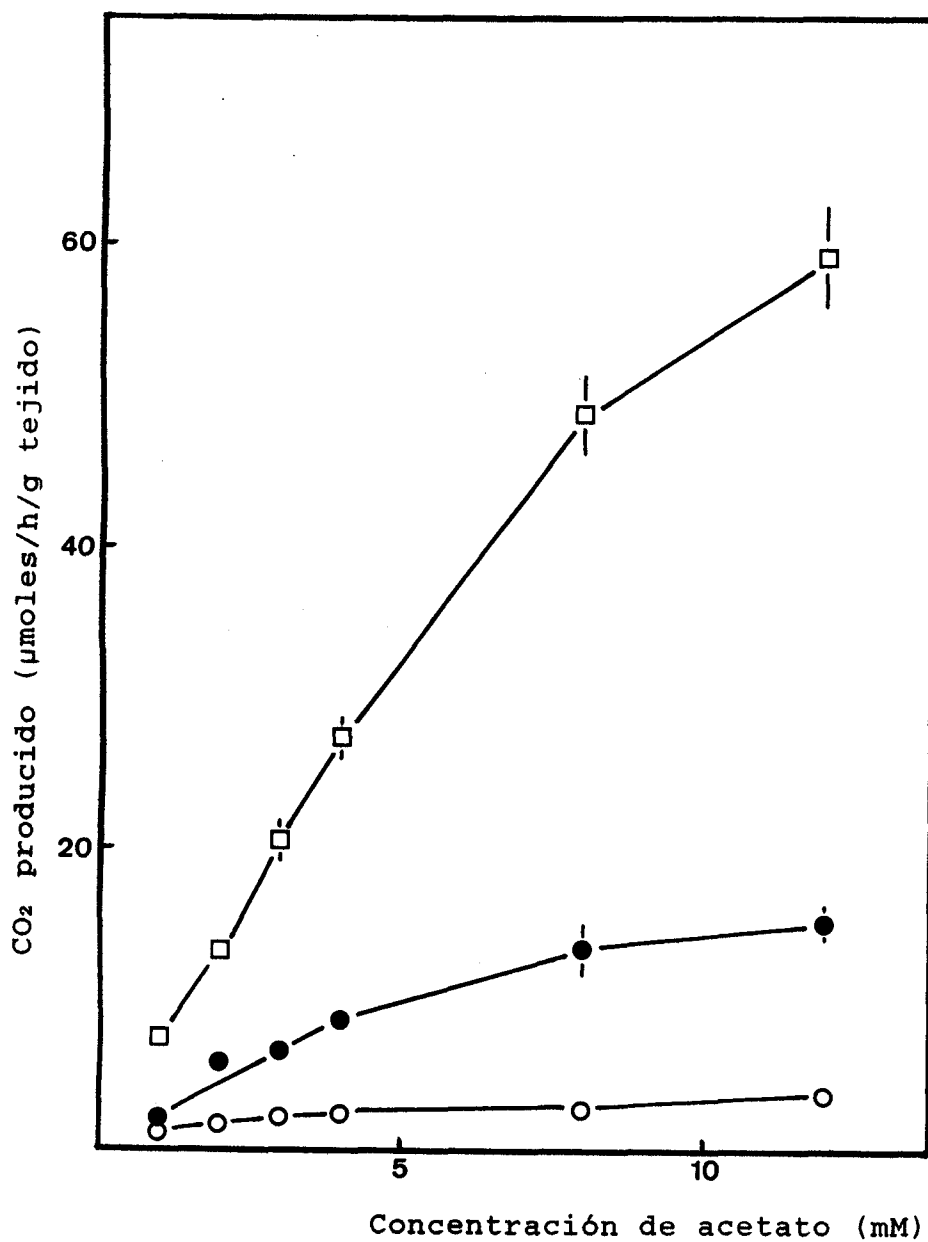


FIGURA 20

Producción de CO<sub>2</sub> por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑON (□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función de la concentración de acetato en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

Tiempo de incubación (min)	CO <sub>2</sub> producido (μmoles/g tejido)		
	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
15	0.94 ± 0.05	3.10 ± 0.11	0.49 ± 0.01
30	2.61 ± 0.12	10.36 ± 0.47	1.03 ± 0.02
45	3.37 ± 0.24	14.94 ± 0.62	1.59 ± 0.03
60	4.07 ± 0.25	21.04 ± 0.53	2.11 ± 0.09
90	5.62 ± 0.31	22.96 ± 0.32	3.05 ± 0.12
120	8.23 ± 0.33	23.00 ± 0.36	4.22 ± 0.29

TABLA 26. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato 3 mM, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

capacidad de oxidación del acetato, siendo proporcional la producción de CO<sub>2</sub> hasta los 60 minutos para tender a estabilizarse posteriormente (Fig. 21).

En el caso del hígado y de la mucosa duodenal, la producción de CO<sub>2</sub> aumenta linealmente con el tiempo de reacción ensayado (15-120 minutos). No obstante, y a la vista de los resultados obtenidos en riñón, en adelante las reacciones de incubación se mantuvieron sólo durante 60 minutos.

#### B.1.b. Incorporación a lípidos insaponificables totales

##### B.1.b.1. Efecto del peso de tejido

Los resultados obtenidos tras la incubación de acetato 3 mM con cantidades crecientes de cortes de hígado y de riñón, y de raspado de mucosa duodenal, durante un período de 60 minutos, se expresan en la Tabla 27. En ella se puede apreciar que la incorporación de acetato a insaponificables totales es mayor en hígado que en los otros dos tejidos, dentro de los márgenes de linealidad observados (Fig. 22). En cualquier caso, la producción de insaponificables por parte del hígado parece presentar límites de proporcionalidad más bajos que en los otros dos casos.

##### B.1.b.2. Efecto de la concentración de acetato

Se ha estudiado el efecto de la suplementación de diferentes concentraciones de acetato (1-12 mM) a cortes de hígado y de riñón y a raspado de mucosa duodenal, utilizando pesos comprendidos dentro de los límites de proporcionalidad antes observados, y llevándose a cabo las reacciones de incubación durante 60 minutos. La Tabla 28 pone de manifiesto que

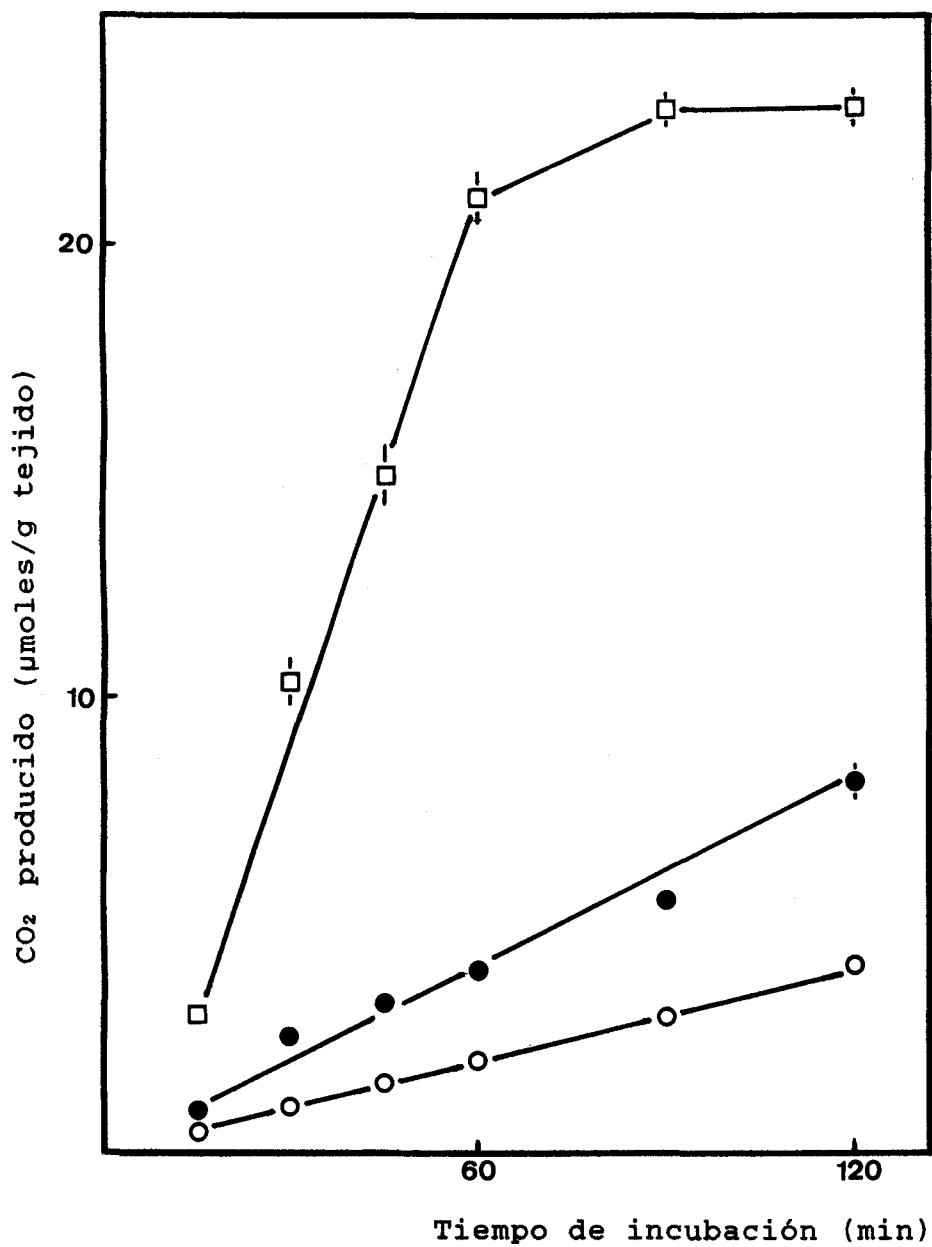


FIGURA 21

Producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato 3 mM por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑON(□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función del tiempo de incubación en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.



Peso de tejido (mg)	Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales (nmoles/h)		
	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
50	28.72 ± 1.93	3.21 ± 0.10	2.72 ± 0.02
100	51.80 ± 2.32	5.23 ± 0.10	4.83 ± 0.04
150	66.27 ± 3.24	8.20 ± 0.34	5.91 ± 0.18
200	60.83 ± 4.48	7.87 ± 0.62	5.48 ± 0.24

TABLA 27. Efecto del peso de tejido sobre la incorporación de acetato 3 mM a lípidos insaponificables totales, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

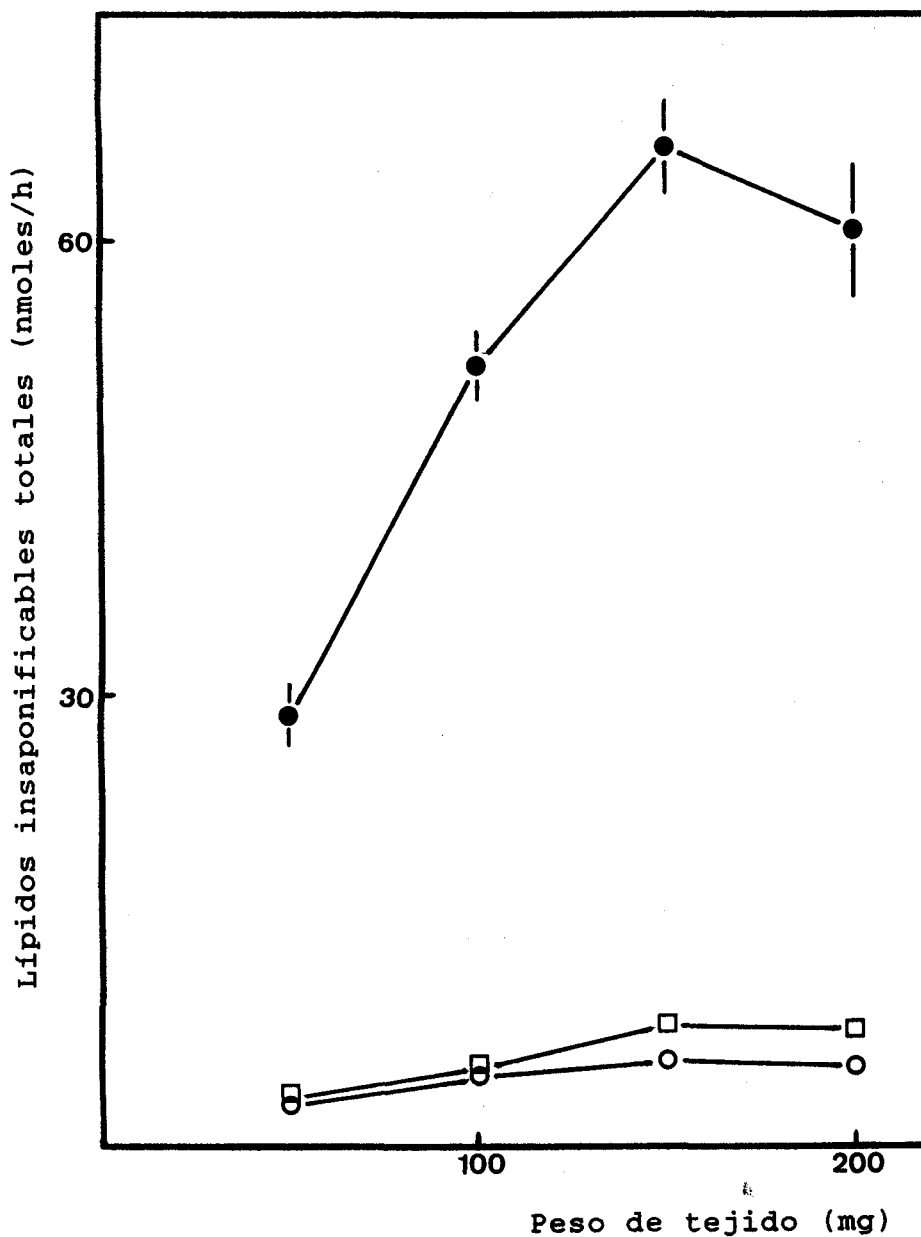


FIGURA 22

Incorporación de acetato 3 mM a lípidos insaponificables totales por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑON(□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función del peso de tejido utilizado en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

Concentración de acetato (mM)	Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales (nmoles/h/g tejido)		
	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
1	275.71 ± 24.25	25.22 ± 0.26	27.52 ± 0.38
2	536.75 ± 39.76	41.83 ± 1.14	38.84 ± 1.23
3	764.63 ± 35.52	46.25 ± 0.77	57.81 ± 4.48
4	948.20 ± 19.68	68.78 ± 4.38	57.60 ± 7.13
8	1225.71 ± 83.62	120.48 ± 17.55	72.32 ± 5.05
12	1069.16 ± 56.90	135.81 ± 12.67	87.18 ± 2.58

TABLA 28. Efecto de la concentración de acetato sobre su incorporación a lípidos insaponificables totales, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

en dichas condiciones, la incorporación a lípidos insaponificables por cortes hepáticos parece alcanzar un máximo a concentración 8 mM de acetato, tendiendo a mantenerse en niveles prácticamente constantes para concentraciones mayores (Fig. 23).

Como contraste, la incorporación por riñón y por mucosa duodenal se incrementa de un modo esencialmente lineal con la concentración de sustrato disponible, si bien los valores alcanzados son muy inferiores a los obtenidos en el hígado.

#### B.1.b.3. Efecto del tiempo de incubación

Con objeto de complementar las condiciones óptimas para el estudio de la incorporación *in vitro* de acetato a lípidos insaponificables, se realizaron una serie de experiencias en las que los cortes y raspado habituales se incubaron con acetato 3 mM durante diferentes períodos de tiempo (15-120 minutos). Como se observa en la Tabla 29, la cantidad de lípidos insaponificables totales formados es proporcional al tiempo de incubación ensayado, siendo en cualquier caso claramente superior en hígado que en riñón o en mucosa duodenal (Fig. 24).

De acuerdo con los resultados parciales recogidos en las Tablas 24 a 29 se ha establecido una comparación entre la capacidad exhibida por los diferentes tejidos estudiados para metabolizar acetato en condiciones *in vitro* hasta CO<sub>2</sub> y lípidos insaponificables, lo que puede resumirse en la Tabla 30. En ella puede apreciarse cómo el hígado es el tejido que presenta la mayor actividad colesterogénica -seguido por el riñón y la mucosa duodenal (12% y 10%, respectivamente, de la capacidad de incorporación hepática)-, siendo el riñón quien produce CO<sub>2</sub> a mayor velocidad.



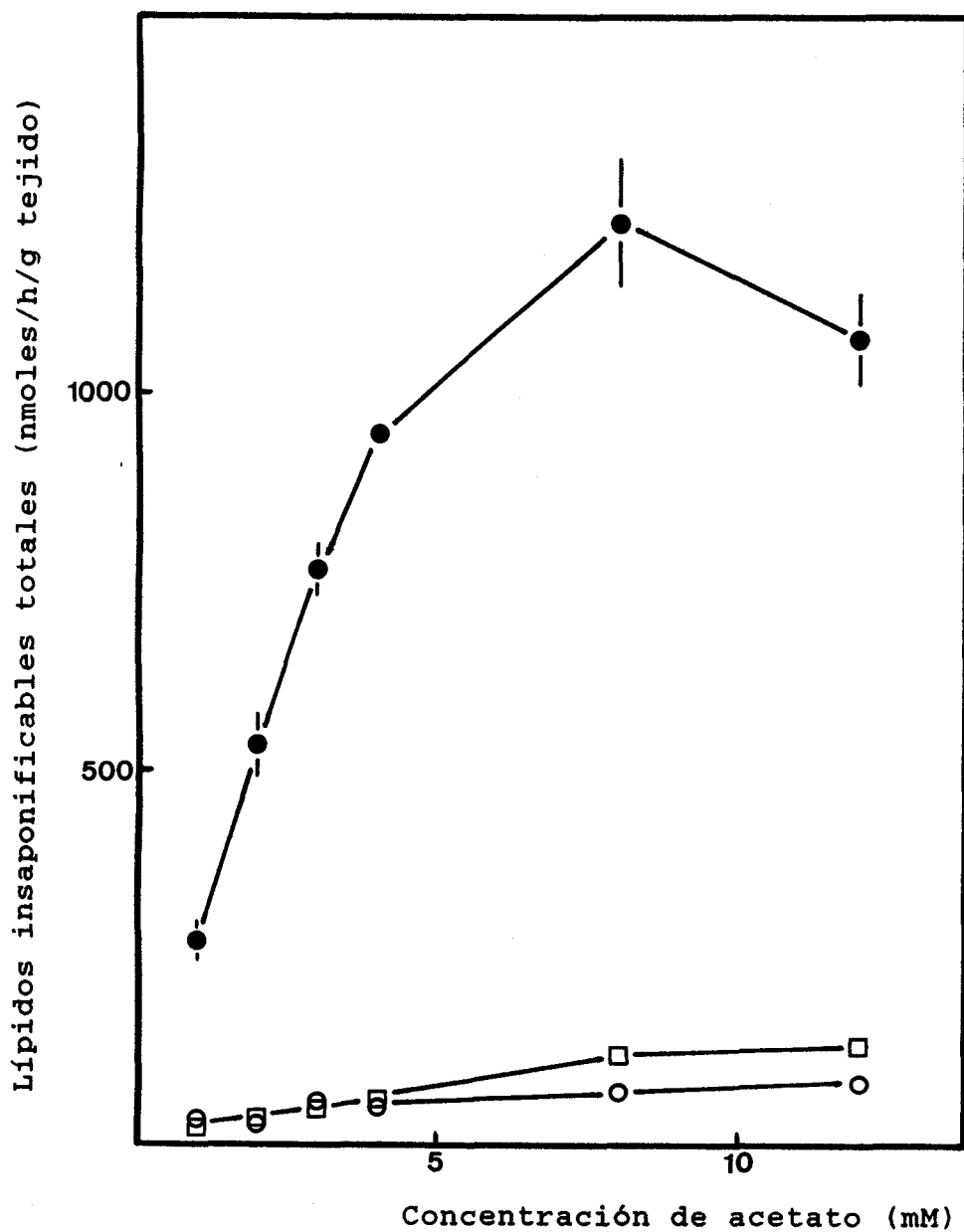


FIGURA 23

Incorporación de acetato 3 mM a lípidos insaponificables totales por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑON(□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función de la concentración de sustrato utilizada en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

Acetato incorporado a lípidos insaponificables totales  
(nmoles/g tejido)

Tiempo de incubación (min)	Hígado	Riñón	Mucosa duodenal
15	70.35 ± 0.78	34.34 ± 6.36	17.10 ± 1.90
30	191.36 ± 9.36	51.86 ± 8.91	32.80 ± 3.20
45	269.70 ± 3.35	71.67 ± 2.72	47.58 ± 5.02
60	332.38 ± 31.62	92.31 ± 9.43	55.00 ± 9.50
90	447.58 ± 17.46	120.08 ± 2.43	84.78 ± 7.42
120	598.73 ± 4.90	135.29 ± 18.96	112.80 ± 8.40

TABLA 29. Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de acetato 3 mM a lípidos insaponificables totales, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio ± E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

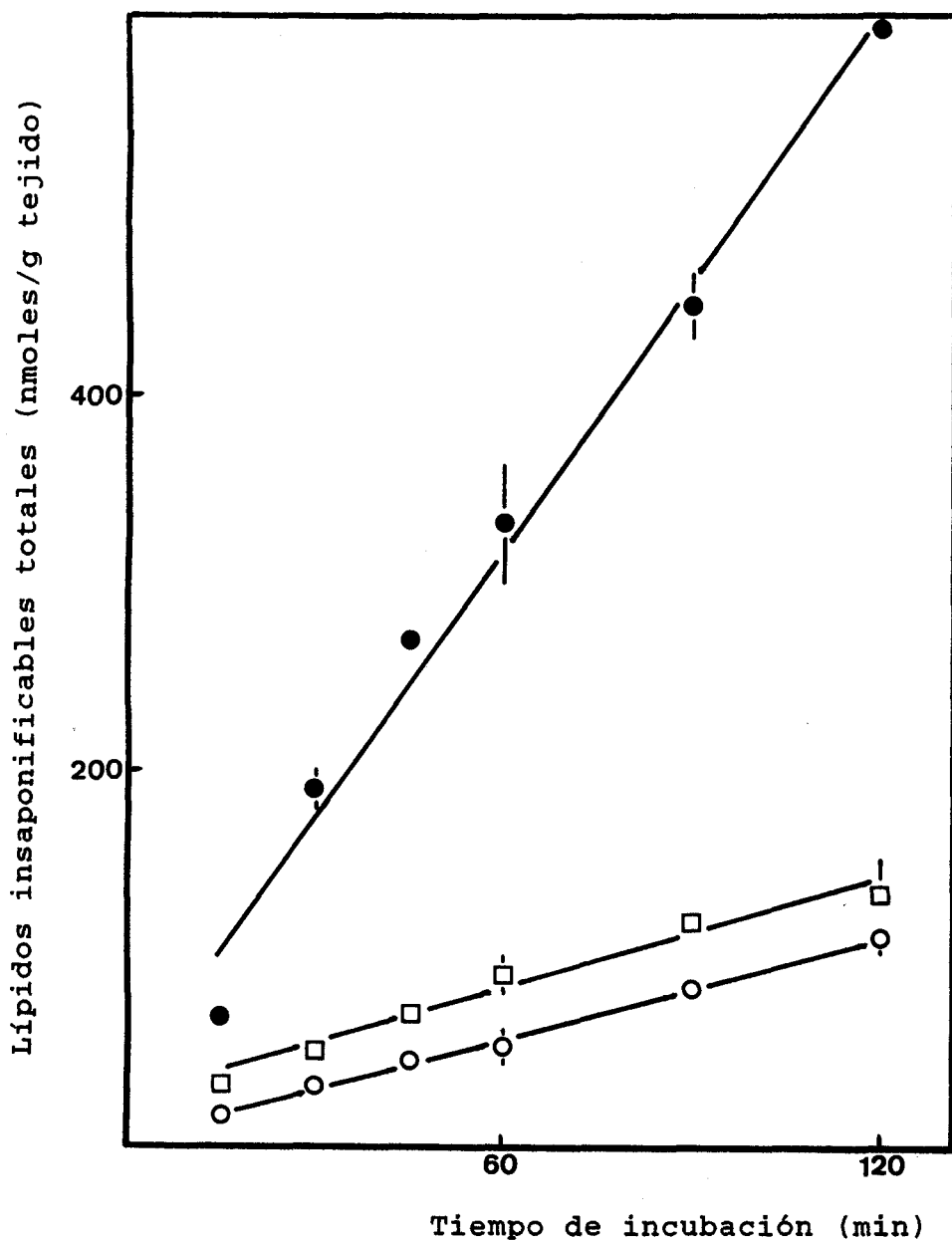


FIGURA 24

Incorporación de acetato 3 mM a lípidos insaponificables totales por CORTES DE HIGADO(●) y DE RIÑÓN(□), y por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL(O), en función del tiempo de incubación en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  E.E. de los obtenidos en 3 experiencias.

Valores relativos

Tejido	Producción de insaponificables totales	Producción de CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> / lípidos insaponificables
HIGADO	100	24	10.3
RIÑON	12	100	365.1
MUCOSA DUODENAL	10	10	47.7

TABLA 30. Comparación de la capacidad para metabolizar acetato hasta lípidos insaponificables y CO<sub>2</sub> por parte del HIGADO, RIÑON y MUCOSA DUODENAL de pollos de 15 días de edad en condiciones *in vitro*.



Por otra parte, si en cada tejido se comparan ambas actividades metabólicas se observa que aun siendo siempre la producción de CO<sub>2</sub> superior a la de lípidos insaponificables, dicha proporción es mucho mayor en riñón, seguida por la mucosa duodenal y el hígado.

La máxima capacidad sintetizadora de insaponificables exhibida por el hígado de pollos de 15 días concuerda con las diferencias encontradas en los mismos tejidos estudiados con respecto a la actividad HMG-Co A reductasa, enzima limitante de la colesterogénesis: el hígado muestra una actividad reductasa del orden de unas 10 veces superior a las observadas en mucosa duodenal y riñón (Alejandre y col., 1981).

Por otra parte, la baja actividad esterologénica mostrada *in vitro* por el riñón a partir de acetato, coincide con los resultados obtenidos *in vivo* y contrasta de nuevo con la máxima importancia de dicho órgano en el metabolismo del mevalonato.

Asimismo, el porcentaje relativo de utilización del acetato para la síntesis de insaponificables por parte de la mucosa duodenal respecto del hígado, está de acuerdo con la contribución proporcional del intestino a la síntesis de colesterol total en el animal, así como al segregado al plasma (McIntyre e Isselbacker, 1973; Lutton, 1976).

Respecto de la utilización de acetato como precursor colesterogénico en hígado, se han descrito algunas limitaciones que apuntan hacia un aumento del "pool" citosólico de acetyl CoA destinado para la síntesis de colesterol, provocado por el [1-<sup>14</sup>C]acetato, pero no que se encuentre en equilibrio con el "pool" mitocondrial usado para la cetogénesis (Dietschy y McGarry 1974). Sin embargo, a pesar de estos y otros errores descritos en tejidos extrahepáticos usando distintos sustratos marcados con

$^{14}\text{C}$  (Andersen y Dietschy, 1979), los resultados presentados en esta Memoria indican que la colesterogénesis -medida como incorporación de acetato a lípidos insaponificables- es máxima en hígado y muy inferior en riñón y en mucosa duodenal, al menos durante los primeros estadios de desarrollo posnatal del pollo.

#### B.1.c. Incorporación a las distintas fracciones insaponificables

Tal como se llevó a cabo en condiciones *in vivo*, se ha estudiado *in vitro* la distribución de la radiactividad procedente del acetato -y recuperada como insaponificables totales- entre las distintas fracciones separadas e identificadas por cromatografía en capa fina. Dicho estudio se realizó en función de la concentración de acetato y del tiempo de incubación, utilizando cortes de hígado y de riñón, así como raspado de mucosa duodenal, en cantidades comprendidas dentro de los límites de proporcionalidad antes observados.

##### B.1.c.1. Efecto de la concentración de acetato

Con objeto de comprobar el posible efecto de la concentración de sustrato adicionado, sobre los porcentajes de los diferentes insaponificables, se llevaron a cabo experiencias en que se utilizaron concentraciones 1-12 mM de acetato. Los resultados obtenidos en hígado se muestran en la Tabla 31, en la que puede apreciarse cómo el colesterol es el principal insaponificable sintetizado, seguido por los polares y observándose pequeños porcentajes de lanosterol, óxido(s) de escualeno y escualeno. Sin embargo, la concentración de acetato adicionado no parece influir sobre los diversos porcentajes observados (Fig. 25), obteniéndose un promedio de 57.70% de colesterol y de 37.82% de insaponificables polares.

Concentración de acetato (mM)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables				
	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
1	0.81	1.60	2.75	35.37	59.47
2	0.54	1.32	2.32	43.76	52.06
3	0.57	1.40	2.14	37.37	58.52
8	1.35	1.51	2.21	34.67	60.26
12	1.30	1.52	1.05	37.93	58.20

TABLA 31. Efecto de la concentración de acetato sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por CORTES DE HIGADO, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

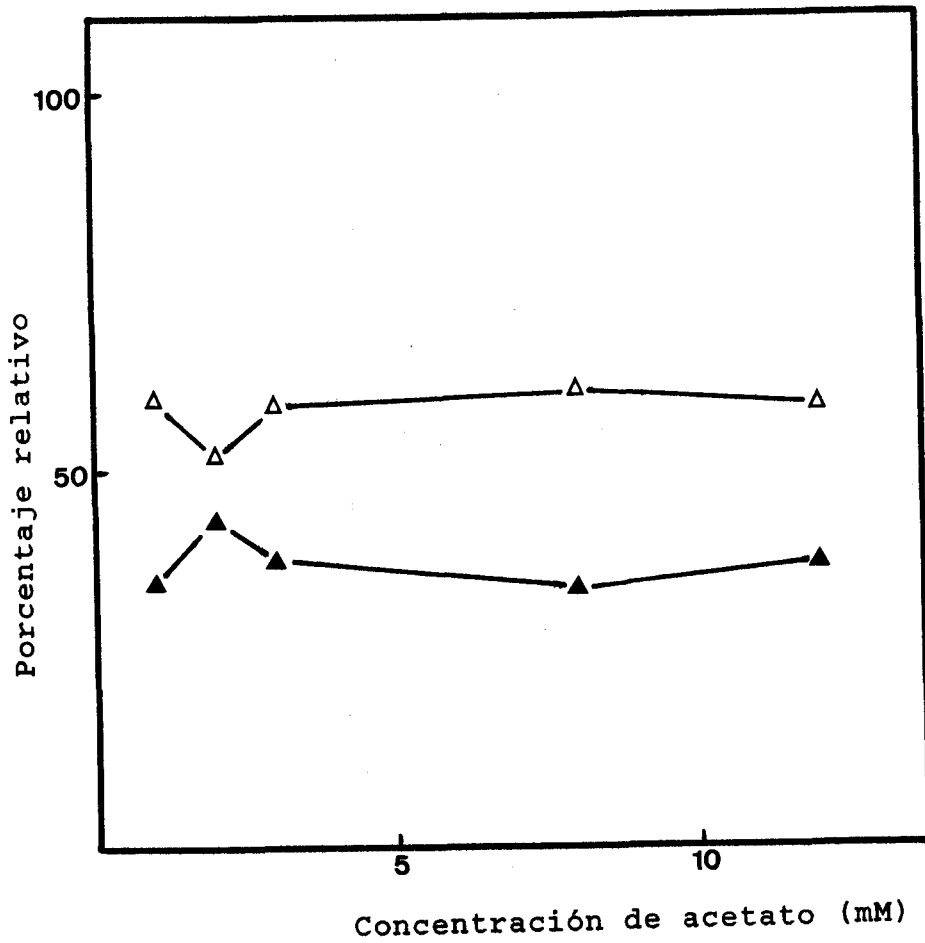


FIGURA 25

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato por CORTES DE HIGADO, en función de la concentración de sustrato y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

En el caso de los cortes de riñón, los porcentajes encontrados parecen depender de la concentración de acetato utilizado (Tabla 32), ya que a concentraciones bajas (1-3 mM) los porcentajes medios de colesterol e insaponificables polares son similares -37.02% y 36.62%, respectivamente-, mientras que para concentraciones superiores (8-12 mM) la proporción de colesterol disminuye -11.05% de promedio- y la de insaponificables polares aumenta -77.74% de promedio- (Fig. 26).

En el raspado de mucosa duodenal, los cambios no parecen ser tan acusados (Tabla 33), si bien presentan signo contrario en el sentido de que el porcentaje de colesterol medio -39.56%- para concentraciones bajas de acetato (1-3 mM), aumenta con dicha concentración -51.16% de promedio para acetato 8-12 mM). Sin embargo, los insaponificables polares parecen acumularse en mayor proporción -52.21%- para concentraciones 1-3mM de acetato, disminuyendo ligeramente -43.44%- a concentraciones altas de sustrato (8-12 mM). En cualquier caso, los porcentajes de una y otra fracción en este tejido son mucho más semejantes entre sí que los obtenidos para hígado y riñón (Fig. 27).

#### B.1.c.2. Efecto del tiempo de incubación

Utilizando una concentración 3 mM de acetato, se ha determinado el porcentaje de los diferentes insaponificables sintetizados al cabo de distintos tiempos de incubación (15-120 minutos). Los resultados obtenidos en hígado (Tabla 34) ponen de manifiesto que el porcentaje de colesterol -insaponificable mayoritario- no parece modificarse en relación al tiempo de incubación (Fig. 28), alcanzando el 54.56% de promedio, valor por otra parte similar al obtenido para cualquier concentración de acetato. Lo mismo puede decirse de la fracción de lípidos insaponificables polares, cuyo porcentaje no cambia sensiblemente dentro de los márgenes de tiempo ensayados (alrededor del 39%).

Concentración de acetato (mM)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables				
	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
1	6.73	5.70	15.60	26.39	45.58
2	5.50	12.47	15.68	33.32	33.03
3	--	8.01	9.38	50.16	32.45
8	--	--	11.32	79.25	9.43
12	--	--	10.94	76.24	12.67

TABLA 32. Efecto de la concentración de acetato sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por CORTES DE RIÑON, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

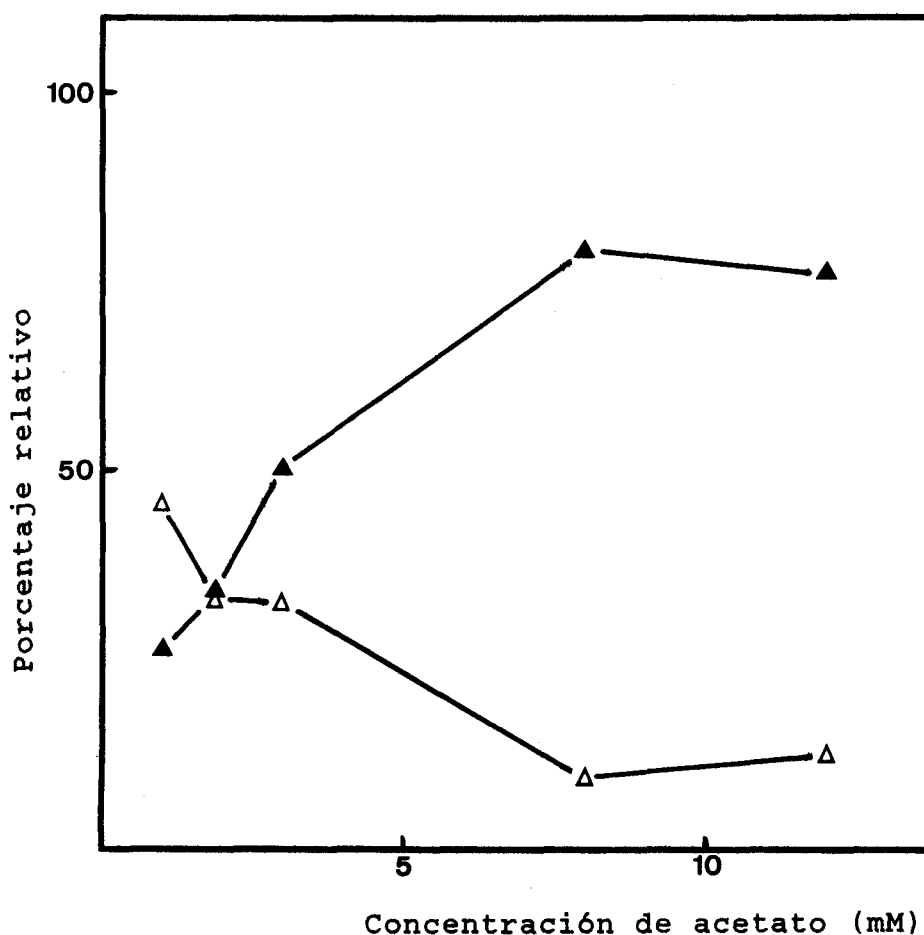


FIGURA 26

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato por CORTES DE RIÑON, en función de la concentración de sustrato y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Concentración de acetato (mM)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables		
	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
1	8.47	50.30	41.23
2	9.29	51.20	39.51
3	6.94	55.12	37.94
8	3.76	41.19	55.05
12	7.03	45.69	47.28

TABLA 33. Efecto de la concentración de acetato sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.



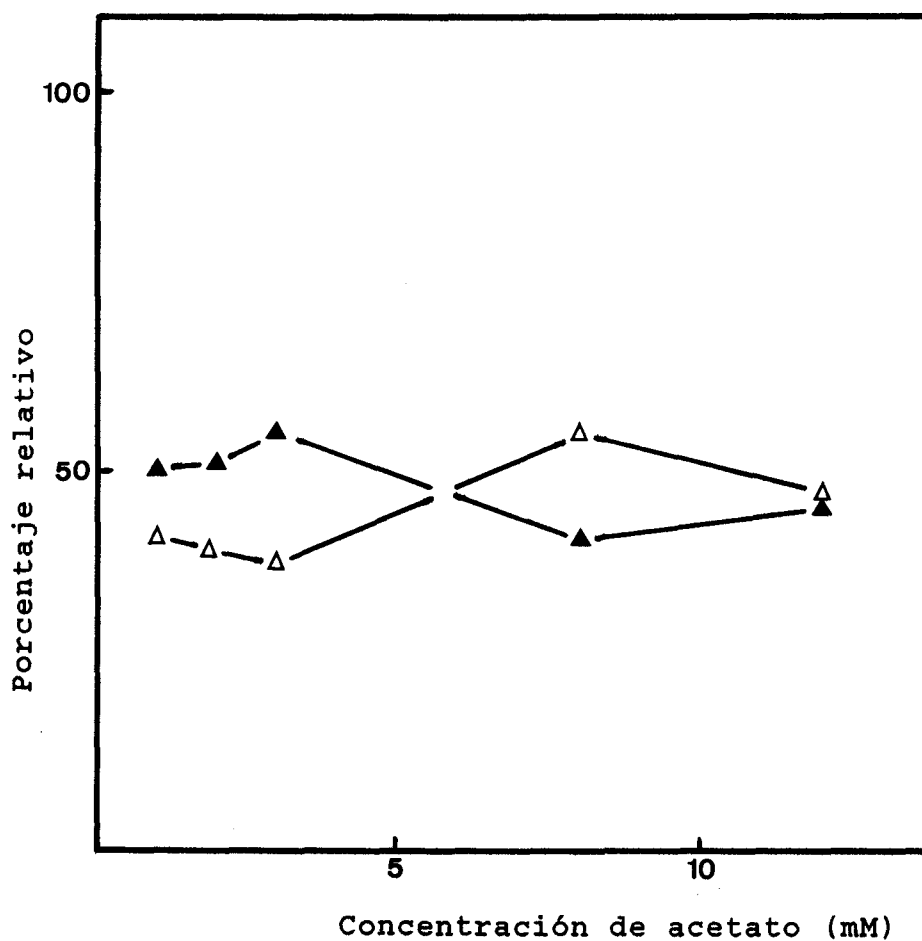


FIGURA 27

Porcentaje de colesterol( $\Delta$ ) y de lípidos insaponificables polares( $\blacktriangle$ ) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL, en función de la concentración de sustrato y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables

Tiempo de incubación (min)	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	1.57	2.25	4.32	46.53	45.33
30	0.42	2.24	4.48	37.58	55.28
60	0.13	1.00	1.38	40.91	56.58
90	1.88	2.26	2.51	37.19	56.16
120	1.30	2.19	3.05	34.00	59.46

TABLA 34. Efecto del tiempo de incubación sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por CORTES DE HIGADO a partir de acetato 3 mM, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

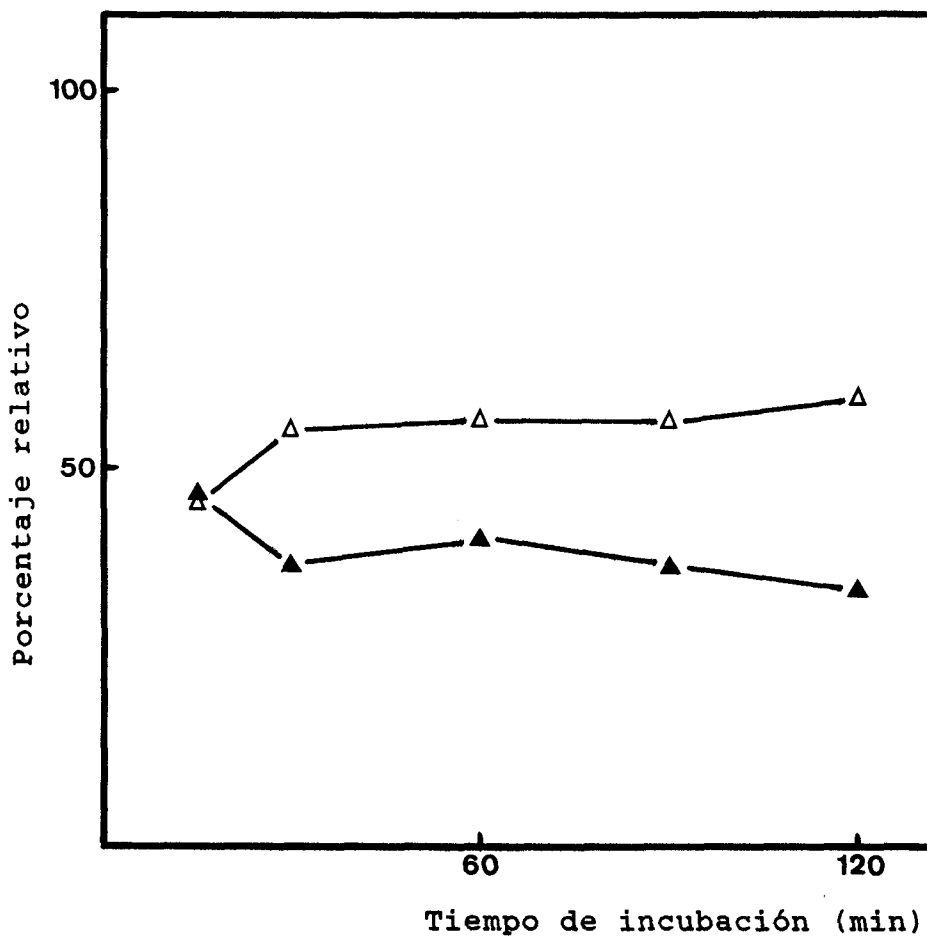


FIGURA 28

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato 3 mM por CORTES DE HIGADO, en función del tiempo de incubación y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Tampoco en el caso del riñón -órgano que se mostraba dependiente de la concentración de acetato- cambian los porcentajes de insaponificables observados (Tabla 35), manteniéndose siempre los niveles de colesterol más bajos que los de insaponificables polares (Fig. 29).

Por último, en la mucosa duodenal también predomina la proporción de insaponificables polares a cualquier tiempo de incubación (Tabla 36), si bien las diferencias respecto al porcentaje de colesterol no parecen ser tan acusadas como en el caso del riñón. Además, los niveles de ambas fracciones no parecen depender del tiempo de incubación ensayado (Fig. 30).

Del conjunto de experiencias *in vitro* sobre la incorporación de acetato a los diferentes lípidos insaponificables merecen destacarse, entre otros, los siguientes aspectos.

En primer lugar, el porcentaje de colesterol acumulado en hígado en cualquiera de las condiciones ensayadas, aunque es mayor que el de cualquier otro insaponificable, no llega nunca a ser tan elevado como el que se sintetiza en condiciones *in vivo* en dicho órgano -alrededor del 90%- , acumulándose en cambio una importante proporción de insaponificables polares, identificados como derivados del lanosterol y precursores, por tanto, del propio colesterol. Esta diferencia parece señalar que en condiciones *in vitro* las últimas etapas de la colesterogénesis hepática pueden verse dificultadas, circunstancia que no acontece *in vivo* al ser el acetato rápidamente incorporado a colesterol.

Por otra parte, y tanto en hígado como en riñón, los porcentajes de escualeno y su(s) óxido(s) no son tan elevados como los obtenidos a partir de mevalonato -especialmente en caso del riñón (Aguilera y col., 1983)-, aunque si superan a los producidos en condiciones *in vivo* a partir de acetato.

Tiempo de incubación (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables				
	Escualeno	Oxido(s) de escualeno	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	--	0.84	1.50	73.69	23.97
30	--	1.50	4.73	66.49	27.28
60	3.39	3.42	3.52	59.91	29.76
90	2.78	1.16	3.02	67.01	26.03
120	3.45	1.68	3.61	64.66	26.60

TABLA 35. Efecto del tiempo de incubación sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por CORTES DE RIÑON a partir de acetato 3 mM, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

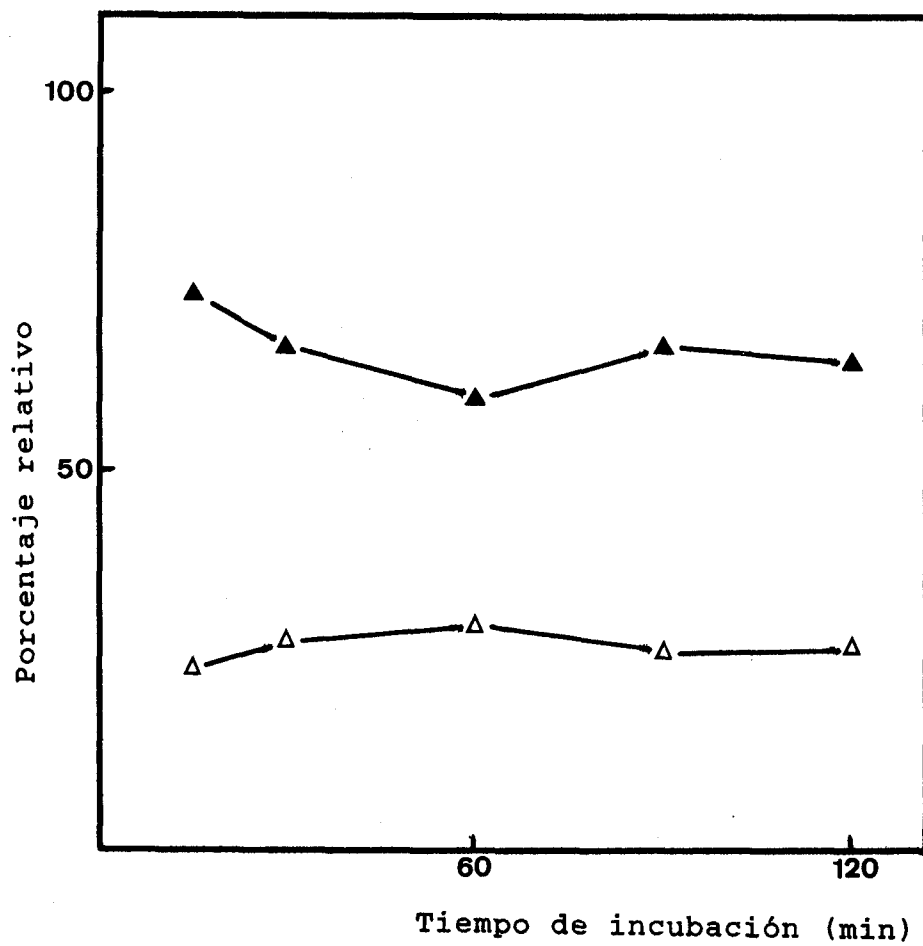


FIGURA 29

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato 3 mM por CORTES DE RIÑON, en función del tiempo de incubación y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.

Tiempo de incubación (min)	Porcentaje de diferentes lípidos insaponificables		
	Lanosterol	Insaponificables polares	Colesterol
15	--	59.94	40.06
30	4.70	57.74	37.56
60	5.93	61.39	32.68
90	7.91	56.77	35.32
120	5.98	49.99	44.03

TABLA 36. Efecto del tiempo de incubación sobre el porcentaje de los diferentes lípidos insaponificables sintetizados por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL a partir de acetato 3 mM, en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una. Las diferencias entre dichos valores no exceden del 20%.

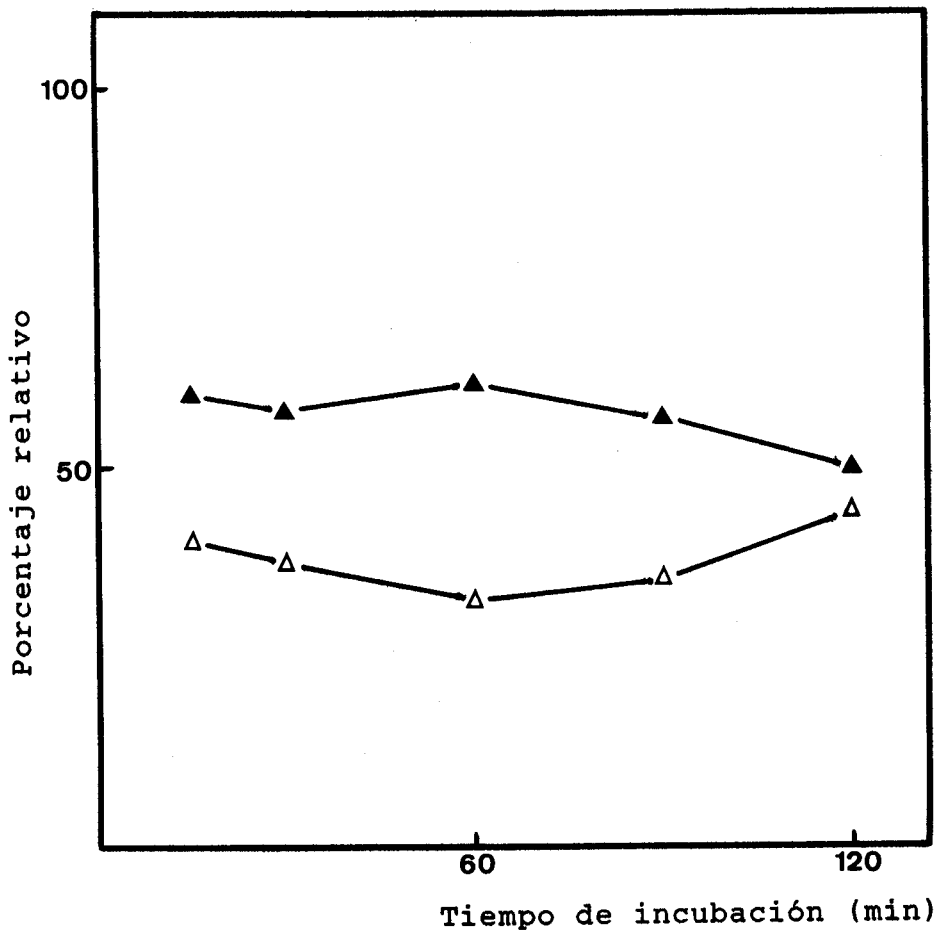


FIGURA 30

Porcentaje de colesterol(Δ) y de lípidos insaponificables polares(▲) dentro de la fracción de insaponificables totales incorporados a partir de acetato 3 mM por RASPADO DE MUCOSA DUODENAL, en función del tiempo de incubación y en condiciones *in vitro*. Los resultados se expresan como el valor medio de los obtenidos en 3 experiencias con determinaciones por duplicado en cada una.



Tampoco en la mucosa duodenal se observan más intermediarios que los insaponificables polares y el propio colesterol, lo que contrasta con los resultados obtenidos en células aisladas de intestino de rata, donde después de 2 horas de incubación aparece un 29% de la radiactividad del [1-<sup>14</sup>C]acetato como escualeno en las células de las vellosidades y un 19% en las de las criptas (Strandberg y col., 1981), valores claramente superiores a los encontrados en esta Memoria para la mucosa duodenal de pollo.

Un último aspecto es interesante resaltar. Mientras que la incorporación de acetato a insaponificables totales es proporcional al tiempo de incubación ensayado en los tres tejidos, el porcentaje de cualquiera de ellos es independiente de dicho tiempo -manteniéndose prácticamente constantes a partir de los 15 minutos-, lo que contrasta con las fuertes variaciones encontradas en las experiencias realizadas *in vivo*.

En resumen, las condiciones utilizadas en los ensayos y la naturaleza del precursor empleado (acetato o mevalonato) muestran una marcada influencia sobre la capacidad de síntesis y/o acumulación de los diferentes lípidos insaponificables por el hígado, riñón y mucosa duodenal, lo cual abre un extenso campo a investigaciones futuras relacionadas con el posible papel regulador de alguno o algunos intermediarios sobre las diferentes etapas de la colesterogénesis. En este sentido, recientemente se ha demostrado en este Departamento que los insaponificables polares -identificados como derivados del lanosterol- producen una marcada inhibición de la HMG CoA reductasa, lo que constituye la primera evidencia de dicha inhibición mediada por compuestos sintetizados en los propios tejidos, tanto a partir de acetato como de mevalonato (Aguilera y col., 1987b).

C. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO



De acuerdo con la influencia que los niveles de hormonas tiroideas presentan sobre la síntesis y degradación del colesterol, se ha estudiado el efecto del 6-n-propil-2-tiouracilo (PTU), de la triiodotironina ( $T_3$ ) y de la tetraiodotironina o tiroxina ( $T_4$ ) sobre el metabolismo del acetato, estableciéndose las correspondientes comparaciones respecto a la utilización del mevalonato como sustrato colesterogénico y cetogénico.

En la mayor parte de los casos, se han llevado a cabo experiencias *in vitro* e *in vivo* de acuerdo con las condiciones especificadas en el apartado de Material y Métodos, y se han desarrollado solamente en hígado y riñón, dada la importancia de estos órganos en los procesos estudiados.

C.1. TRATAMIENTO CON PTU

C.1.a. Experiencias in vitro

Se han llevado a cabo las reacciones utilizando pollos de tres edades diferentes -15, 30 y 60 días- a los que se inyectó subcutáneamente 1 mg de PTU por 100 g de peso y día, prolongando el tratamiento durante los 7 días anteriores a la correspondiente edad.

Dada la gran variabilidad de los datos numéricos obtenidos y con objeto de facilitar el estudio comparativo entre los distintos tipos de experiencias y determinaciones, los resultados se han representado dividiendo los valores medios obtenidos en los animales tratados por los valores medios en los correspondientes controles, indicando entre paréntesis el número de animales utilizados en cada caso, así como el grado de significación estadística cuando ésta exista.

C.1.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones

Independientemente del aumento debido a la edad, ni el peso corporal ni el del hígado y los riñones se ven afectados significativamente por el tratamiento con PTU, en cualquiera de los días en que se considere (Tabla 37). Estos resultados difieren de los obtenidos recientemente en rata de distintas edades (Hahn, 1986), en las que la adición de 0.05% de PTU en el agua de bebida produce una significativa reducción del peso corporal, tanto en fetos como en ratas de 0-30 días. Sin embargo, datos anteriores (Raheja y Snedecor, 1975) parecían indicar que la edad ejerce una cierta influencia sobre el desarrollo de

Edad (días)	Peso corporal	Peso hígado	Peso riñones
15	1.119 (6)	1.007 (6)	1.204 (6)
30	0.906 (6)	1.108 (6)	1.209 (6)
60	1.032 (6)	0.956 (6)	0.973 (6)

TABLA 37. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Experiencias *in vitro*. Los resultados se expresan como la relación entre los valores obtenidos en animales tratados y los correspondientes controles, indicando el número de ejemplares entre paréntesis.

hipotiroidismo por el PTU en pollo, ocurriendo antes y de un modo más severo en animales jóvenes. En concreto, el peso corporal resulta disminuido tras una sola inyección de 250 µg de PTU a embriones de 11 días que se sacrificaron al cabo de 9 días de tratamiento, mientras que el peso del hígado no se modifica significativamente (Raheja y Linscheer, 1979). Tampoco Keyes y col. (1981) encontraron diferencias significativas en el peso corporal ni en el de hígado en ratas tratadas con PTU durante 1 ó 7 días.

#### C.1.a.2. Efecto sobre los niveles séricos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>

Un tratamiento semejante al descrito anteriormente determina un aumento muy significativo de los niveles séricos de T<sub>3</sub> en todas las edades ensayadas, si bien dicho aumento es menos ostensible a medida que se incrementa la edad (Tabla 38). En cuanto a los niveles de T<sub>4</sub>, el PTU no presenta ningún efecto significativo, lo que contrasta con el conocido efecto hipotiroideo del agente en estudio, incluso en embrión de pollo donde se ha puesto de manifiesto una drástica disminución de los niveles plasmáticos de T<sub>4</sub> (Raheja y Linscheer, 1979). Hay que destacar, sin embargo, que la mayor parte de los estudios anteriormente referidos se llevaron a cabo utilizando una sola inyección de PTU, y se han descrito diferencias importantes cuando el tratamiento se prolonga durante una semana o más (Cooper y col., 1983).

#### C.1.a.3. Efecto sobre el metabolismo del acetato

Se ha estudiado el posible efecto de la inyección diaria de PTU sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato. Las reacciones *in vitro* se han llevado a cabo en las condiciones óptimas puestas de manifiesto en las experiencias descritas anteriormente: cortes de hígado y de riñón en cantidades comprendidas en el margen de linealidad,

Edad (días)	Niveles séricos de hormonas tiroideas	
	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
15	1.496 (5) <sup>a</sup>	1.089 (5)
30	1.209 (4) <sup>b</sup>	0.971 (5)
60	1.116 (3) <sup>c</sup>	1.310 (3) <sup>*</sup>

TABLA 38. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre los niveles séricos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio para experiencias *in vitro*. Los resultados se expresan como en la Tabla 37. \* indica una variación superior al 20% entre valores obtenidos en idénticas condiciones, lo cual determina que las diferencias no sean estadísticamente significativas. <sup>a</sup> p<0.001 <sup>b</sup> p<0.01 <sup>c</sup> p<0.05



incubados durante 60 minutos en presencia de acetato 3 mM.

Ni en cortes de hígado ni de riñón, la inyección previa durante 7 días de PTU induce cambios significativos en la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato (Tabla 39). Asimismo, la incorporación de dicho sustrato a lípidos insaponificables totales por cortes hepáticos y renales no se ve afectada significativamente por el PTU (Tabla 39). Estos resultados son, a primera vista, contrarios a los esperados, dada la conocida disminución de la colesterogénesis acontecida en ratas hipotiroideas (Dugan y Porter, 1976). Concretamente, Fletcher y Myant (1958) demostraron que la síntesis de colesterol a partir de acetato por cortes de hígado disminuía en un 80% después de la tiroidectomía, mientras que no se afectaba a partir de mevalonato. Asimismo, Boyd (1959) demostró en ratas hechas hipotiroideas por tratamiento con tiouracilo, que la colesterogénesis hepática a partir de acetato era sólo de 2/3 en comparación con los niveles normales. Sin embargo, el hipotiroidismo se encuentra normalmente acompañado por un aumento en los valores de colesterol sérico, discrepancias que tienden a ser explicadas en base a una acción simultánea de las hormonas del tiroides sobre la degradación del colesterol (Mathé y Chevalier, 1976; Müller y Seitz, 1984). Los resultados expresados en la presente Memoria podrían explicarse por la falta de correlación observada entre el tratamiento con PTU y la concentración sérica de hormonas tiroideas, responsables en último extremo del efecto colesterogénico. En cualquier caso, dada asimismo la variabilidad de los datos obtenidos, serían necesarias nuevas experiencias para poder concretar aún más el posible efecto del tratamiento con PTU sobre la colesterogénesis a partir de acetato en pollo, así como incidir en el conocimiento del efecto que la duración del tratamiento y la edad del animal pueden presentar sobre dicho proceso metabólico.

Edad (días)	Producción de CO <sub>2</sub>		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
15	0.918 (3)	1.011 (3)	1.045 (3)	0.892 (3)
30	1.066 (3)	0.984 (3)	0.838 (3)*	1.238 (3)*
60	0.873 (3)	1.114 (3)	0.794 (3)	0.839 (3)*

TABLA 39. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RIÑON de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38.

C.1.a.4. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato

Teniendo en cuenta que las hormonas del tiroides parecen afectar a la síntesis del colesterol a partir de acetato pero no de mevalonato (Fletcher y Myant, 1958), se han realizado experiencias paralelas a las descritas en el apartado anterior pero utilizando (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonato como precursor y estudiando su conversión en <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> -índice de la ruta cetogénica- o su transformación en lípidos insaponificables totales (medida de la ruta colesterogénica). Como se puede observar en la Tabla 40, la producción de CO<sub>2</sub> *in vitro* a partir de mevalonato, tanto en hígado como fundamentalmente en riñón, disminuye de una manera estadísticamente significativa por tratamiento con PTU, a pesar de las grandes variaciones observadas en la mayor parte de los valores numéricos obtenidos. La disminución puesta de manifiesto en pollos de 60 días no es tan acusada como a los 15 y 30 días, lo cual puede sugerir una cierta disminución de la respuesta a medida que avanza la edad del animal, de un modo semejante a lo descrito por Raheja y Snedecor (1975) respecto a diferentes parámetros modificados por el estado tiroideo. De cualquier forma, estos resultados parecen demostrar una disminución de la ruta cetogénica del mevalonato, confirmando los resultados obtenidos por Feingold y col. (1980) en rata, si bien estos autores sugieren que la citada disminución se debe a un efecto tóxico directo del PTU, sin que se pueda afirmar rotundamente que el hipotiroidismo *per se* altera el metabolismo del mevalonato circulante por dicha vía. Los resultados que se presentan en esta Memoria estarían de acuerdo, al menos parcialmente, con esta hipótesis, ya que al no producir este tratamiento con PTU en el pollo una disminución de las hormonas tiroideas en sangre, el descenso de la ruta cetogénica no puede relacionarse con cambios en los niveles séricos hormonales.

En cuanto a la incorporación del mevalonato *in vitro* a lípidos insaponificables, el tratamiento durante una semana con

Edad (días)	Producción de CO <sub>2</sub>		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
15	0.348 (3) <sup>a</sup>	0.568 (3) <sup>b*</sup>	0.665 (3)*	0.899 (3)*
30	1.115 (3)	0.511 (3) <sup>b*</sup>	1.131 (3)	0.912 (3)*
60	VND	0.956 (3) <sup>b</sup>	0.760 (3)*	0.857 (3)*

TABLA 40. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de mevalonato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RIÑON de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. <sup>a</sup> p<0.001  
<sup>b</sup> p<0.025 VND= valor no disponible

PTU no produce cambios estadísticamente significativos ni en cortes de hígado ni de riñón, si bien en la mayoría de las experiencias realizadas se observan valores menores en los animales tratados que en los controles. De nuevo los resultados aquí presentados coinciden con los obtenidos por Feingold y col. (1980) en rata, donde la síntesis de colesterol por cortes de hígado no se encuentra afectada por el PTU, mientras que en riñón disminuye ligeramente aunque no de una manera estadísticamente significativa.

C.1.b. Experiencias in vivo

Se ha estudiado *in vivo* el metabolismo del acetato y del mevalonato en pollos de 15 y 11 días de edad respectivamente, sometidos a un tratamiento con PTU mediante inyección subcutánea diaria de 1 mg por 100 g de peso, durante 5 ó 10 días. En cada caso, se ha estudiado paralelamente el efecto sobre el peso corporal de los animales, así como el de los principales órganos utilizados.

C.1.b.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones

Como se puede apreciar en la Tabla 41, el tratamiento con PTU durante 5 ó 10 días no produce un efecto significativo sobre los pesos estudiados en pollos de 11 ni de 15 días. Estos resultados confirman los obtenidos previamente en condiciones *in vitro* y parecen demostrar la falta de un efecto claro de este compuesto en pollo, tras diferentes períodos de inyección.

Edad (días)	Tratamiento (días)	Peso corporal	Peso hígado	Peso riñones
11	5	0.933 (7)	0.936 (7)	0.986 (7)
11	10	0.991 (4)	1.057 (4)	0.943 (4)
15	5	1.102 (8)	1.194 (8)	1.001 (8)
15	10	1.092 (7)	1.035 (7)	0.942 (7)

TABLA 41. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones de pollos de 11 y 15 días de edad, inyectados durante 5 y 10 días antes de su sacrificio. Experiencias *in vivo*. Los resultados se expresan como en la Tabla 37.

C.1.b.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato

Utilizando las condiciones óptimas puestas de manifiesto anteriormente para el estudio del acetato *in vivo*, se han llevado a cabo una serie de experiencias para comprobar el efecto del PTU. Tal y como se observa en la Tabla 42, la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración aumenta de una manera significativa en pollos sometidos a tratamiento durante 5 y 10 días.

Sin embargo, la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales no parece verse afectada significativamente por el PTU. De nuevo los resultados *in vivo* coinciden con los obtenidos *in vitro*, corroborando que la inyección de PTU durante 5-10 días consecutivos no afecta a la síntesis de insaponificables totales a partir de acetato en pollo -al menos en las condiciones ensayadas-, contrariamente a la reducción observada en otras especies animales sometidas a tratamientos hipotiroideos (Kritchevsky, 1960).

C.1.b.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato

El tratamiento continuo con PTU no parece afectar significativamente a la ruta cetogénica del mevalonato, estudiada *in vivo* mediante la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración (Tabla 43). Este comportamiento de pollos machos utilizados en las experiencias aquí referidas coincide con los hallados por Feingold y col. (1980) en ratas machos, en las que el tratamiento con PTU durante un mes no afecta significativamente a esta vía metabólica del mevalonato, mientras que en ratas hembras sí se observa una disminución significativa al cabo de 6 horas de la inyección de (R)-[5-<sup>14</sup>C]mevalonato. Estas consideraciones introducen un nuevo factor a tener en cuenta durante la interpretación de los presentes resultados. En efecto, parece existir una marcada diferencia respecto al sexo del metabolismo del mevalonato circulante, ya que la rata hembra transforma el

Tratamiento (días)	Producción de CO <sub>2</sub> en la respiración	Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón
5	1.283 (8) <sup>a</sup>	0.999 (8)	VND
10	1.148 (7) <sup>a</sup>	0.819 (7)*	VND

TABLA 42. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato y en condiciones *in vivo*, en pollos de 15 días de edad inyectados durante 5 y 10 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. <sup>a</sup> p<0.005 VND= valores no disponibles



Tratamiento (días)	Producción de CO <sub>2</sub> en la respiración	Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón
5	1.286 (8)*	0.557 (8)*	0.581 (7)*
10	VND	0.785 (4)*	0.851 (4)*

TABLA 43. Efecto del PTU (1 mg/100 g peso y día) sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración y de lípidos insaponificables totales, a partir de mevalonato y en condiciones *in vivo* en pollos de 11 días de edad, inyectados durante 5 y 10 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. VND= valor no disponible

mevalonato por la ruta cetogénica a una velocidad doble que el macho de la misma especie, mientras que el macho convierte significativamente más mevalonato en colesterol que la hembra (Wiley y col., 1979). En la especie humana, también la hembra oxida un 68% más mevalonato a CO<sub>2</sub> que el macho (Feingold y col., 1980b). De comportarse el pollo de un modo semejante, la falta de efecto del PTU sobre la actividad cetogénica encontrada en los resultados aquí expuestos entraría dentro de la lógica, siendo necesario en todo caso ampliar nuestros estudios a pollos recién nacidos hembras, hasta el momento no utilizados en estas experiencias.

Por otra parte, la incorporación *in vivo* de mevalonato a lípidos insaponificables totales por el hígado y por el riñón de pollos machos de 11 días parece disminuir, especialmente después de 5 días de tratamiento con PTU, aunque las grandes variaciones en los valores numéricos obtenidos en los diferentes animales, hacen que tal disminución no sea estadísticamente significativa, a pesar de situarse cerca del 50% de los valores relativos. De serlo así, se confirmaría una vez más la modificación de la ruta colesterogénica del mevalonato, aunque el comportamiento del hígado y del riñón frente al PTU parece ser prácticamente similar. No obstante, en ratas hechas hipotiroideas con PTU, la síntesis renal de colesterol a partir de mevalonato disminuye un 27% en machos y un 22% en hembras, mientras que no se afecta significativamente en hígado ni en otros tejidos estudiados (Feingold y col., 1980a).

En conjunto, los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* parecen demostrar que el tratamiento con PTU afecta al metabolismo del mevalonato y no sólo al del acetato, como se venía considerando hasta hace tan sólo pocos años.

## C.2. TRATAMIENTO CON T<sub>4</sub>

### C.2.a. Experiencias in vitro

Se han utilizado pollos de 15 días a los que se suministró una inyección subcutánea de 10 ó 50 µg de T<sub>4</sub> por 100 g de peso y día, prolongando el tratamiento durante los 3 ó 7 días anteriores al sacrificio de los animales.

#### C.2.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones

El efecto de la T<sub>4</sub> sobre los pesos estudiados es variable de acuerdo con las condiciones del tratamiento. Así, mientras que el peso corporal desciende significativamente sólo tras la inyección de 10 µg diarios durante 3 días, el peso del hígado lo hace también solamente tras los mismos días para una dosis de 50 µg (Tabla 44). Ninguno de los tratamientos ensayados afecta significativamente al peso de los riñones. Estos resultados son difícilmente explicables y, como se verá al compararlos con los obtenidos *in vivo*, pueden no tener suficiente importancia fisiológica en relación con la acción hormonal.

#### C.2.a.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato

El tratamiento con 10 µg de T<sub>4</sub> durante 3 días incrementa la oxidación del acetato a CO<sub>2</sub> tanto en cortes de hígado como de riñón, si bien dicho aumento es sólo estadísticamente significativo en el primero de los órganos citados (Tabla 45). Si el tratamiento se prolonga durante 7 días, no aparecen diferencias acusadas respecto a los controles en ninguno de los órganos estudiados.

Tratamiento	Peso corporal	Peso hígado	Peso riñones
10 µg , 3 días (9)	0.882 <sup>a</sup>	0.964	0.997
10 µg , 7 días (9)	0.934	0.924	0.946
50 µg , 3 días (12)	0.948	0.816 <sup>a</sup>	0.959

TABLA 44. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones de pollos sacrificados a los 15 días de edad para experiencias *in vitro*. Los resultados se expresan como en la Tabla 37. <sup>a</sup> p<0.01

Tratamiento	Producción de CO <sub>2</sub>		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
10 µg , 3 días	1.371 (6) <sup>b</sup>	1.121 (6)	1.744 (6) <sup>a</sup>	0.366 (6)*
10 µg , 7 días	1.081 (6)	0.872 (6)	1.136 (6)	1.204 (6)*

TABLA 45. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RINON de pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38.  
<sup>a</sup> p<0.001 <sup>b</sup> p<0.025

De un modo paralelo, la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales incrementa significativamente tras 3 días de tratamiento en cortes de hígado, mientras que en el resto de los casos las variaciones no tienen significación estadística, debido a la gran diversidad de valores obtenidos, especialmente en el caso de los cortes renales.

Existen muy pocos datos acerca del efecto de las hormonas tiroideas sobre la oxidación del acetato a  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, es conocida la acción colesterogénica de dichas hormonas, aunque el lugar de actuación es bastante discutido y su mecanismo de acción no se ha establecido perfectamente debido al gran número de efectores metabólicos que influyen sobre el proceso colesterogénico, entre los que estas hormonas sólo pueden considerarse como un componente más (Guder y col., 1968; Dugan y col., 1974). Ya en 1958, Fletcher y Myant demostraron la estimulación tiroidea -de 2 a 3 veces- de la velocidad de síntesis de colesterol a partir de acetato pero no de mevalonato, sugiriendo que el punto de actuación está localizado entre acetato y mevalonato. Estos mismos autores llegaron a resultados semejantes utilizando  $\text{T}_4$  y fracciones libres de células de hígado de rata (Fletcher y Myant, 1960). Asimismo, Nejad y Chaikoff (1963) demostraron que la inyección diaria de 3-6  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$  en ratas hipofisectomizadas aumentaba la conversión de acetato en colesterol por cortes de hígado hasta niveles 10 veces superiores a los exhibidos por animales normales. Sin embargo, la administración de  $\text{T}_4$  a animales normales no afectaba a la colesterogénesis hepática.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que la estimulación de la incorporación de acetato a colesterol por  $\text{T}_4$  no ocurre en todos los tejidos: las glándulas adrenales y el hígado muestran estimulación de la colesterogénesis, mientras que en intestino delgado, riñón, testículos o cerebro no se ha detectado un efecto significativo (Tsung-Chin y Shih-Chen, 1965).

Los resultados aquí expuestos estarían de acuerdo con esta especificidad tisular, si bien no está demostrado si se trata de un efecto específico o de un mero reflejo del incremento generalizado del metabolismo, provocado por esta hormona. El hecho de que también se incremente la oxidación del acetato a  $\text{CO}_2$  en hígado parece apuntar hacia la segunda de las hipótesis mencionadas.

### C.2.a.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato

A pesar de la hipótesis antes mencionada sobre la no interferencia en el metabolismo del mevalonato, se han llevado a cabo reacciones de incubación de este sustrato por cortes de hígado y de riñón de pollos a los que se habían sometido a distintos tratamientos con  $\text{T}_4$ , midiendo en cada caso la producción de  $\text{CO}_2$  y de lípidos insaponificables totales en las condiciones óptimas previamente establecidas.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 46, donde se puede apreciar cómo la ruta cetogénica del mevalonato en riñón -medida como su oxidación a  $\text{CO}_2$ - aumenta el doble después de 3 días de la inyección de 10 ó 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$ , mientras que el tratamiento prolongado no parece originar cambios significativos. La situación en hígado es similar a la de riñón para cualquiera de las condiciones ensayadas. Estos resultados difieren de los encontrados por Feingold y col. (1980a) en ratas sometidas a la inyección intraperitoneal de 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{T}_4$  durante 3 días, en los que la producción de  $\text{CO}_2$  a partir de mevalonato por cortes hepáticos y renales no se ve afectada. Sin embargo, el aumento en la producción de  $\text{CO}_2$  en riñón por el tratamiento con  $\text{T}_4$  coincide con la disminución apreciada por efecto del PTU en pollos de la misma edad y en rata (Feingold y col., 1980a), por lo que puede sugerirse que la ruta cetogénica del mevalonato en riñón se modifica según el estado tiroideo de los animales.

Tratamiento	Producción de CO <sub>2</sub>		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
10 µg , 3 días	1.777 (3)*	2.011 (3) <sup>a</sup>	1.216 (3)	1.062 (3)
10 µg , 7 días	0.937 (3)	0.917 (3)	1.545 (3)*	0.988 (3)
50 µg , 3 días	0.666 (3)*	2.337 (3) <sup>a</sup>	1.010 (3)	0.737 (3)*

TABLA 46. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de mevalonato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RIÑON de pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38.

<sup>a</sup> p<0.001



En cuanto a la incorporación de dicho sustrato a insaponificables totales, la inyección de T<sub>4</sub> durante 3 ó 7 días no produce variaciones significativas en cortes de hígado ni de riñón (Tabla 46) si bien los valores numéricos obtenidos varían ampliamente de una experiencia a otra. De cualquier forma, el hecho de tratarse de pollos machos sugiere que el metabolismo renal del mevalonato se vea poco afectado por el tratamiento hormonal, igual que acontece en rata (Feingold y col., 1980a). Ni en una especie ni en otra la colesterogénesis hepática a partir de mevalonato resulta afectada por la inyección de T<sub>4</sub>, siendo sus niveles muy inferiores a los obtenidos en cortes de riñón como se había observado en experiencias anteriores (Aguilera y col., 1984b).

#### C.2.b. Experiencias in vivo

Se han utilizado pollos de 15 días a los que se suministró una inyección subcutánea diaria de 10, 30 ó 50 µg de T<sub>4</sub> durante los 3 ó 7 días anteriores al sacrificio.

##### C.2.b.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones

La Tabla 47 pone de manifiesto cómo bajo ninguno de los tratamientos ensayados con T<sub>4</sub> -distintas dosis y tiempos- los pesos de los animales ni de sus hígados ni riñones experimentan cambios significativos, lo cual parece indicar que la T<sub>4</sub> no afecta a los mencionados parámetros, máxime teniendo en cuenta que los resultados de dicha Tabla son los valores medios de los obtenidos en dos series de experiencias separadas, en las que se va a utilizar acetato o mevalonato como precursor.

Tratamiento	Peso corporal	Peso hígado	Peso riñones
10 µg , 3 días	0.882 (9)	0.839 (9)	0.855 (9)
10 µg , 7 días	0.934 (9)	1.058 (9)	0.972 (9)
30 µg , 3 días	1.016 (8)	0.967 (6)	1.013 (6)
30 µg , 7 días	0.933 (8)	0.978 (6)	1.027 (6)
50 µg , 3 días	0.948 (9)	0.909 (9)	1.036 (9)
50 µg , 7 días	0.915 (9)	0.957 (9)	0.987 (9)

TABLA 47. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones de pollos sacrificados a los 15 días de edad para experiencias *in vivo*. Los resultados se expresan como en la Tabla 37.

C.2.b.2. Efecto sobre el metabolismo del acetato

La oxidación *in vivo* del acetato a CO<sub>2</sub> y su eliminación mediante el proceso respiratorio, no varía significativamente por efecto de la administración subcutánea de T<sub>4</sub> a ninguna de las dosis -10, 30 ó 50 µg- ni de los tiempos -3 ó 7 días- ensayados (Tabla 48).

Sin embargo, la incorporación a lípidos insaponificables parece aumentar en el hígado, si bien este aumento es más acusado y estadísticamente significativo en los tratamientos de 3 días. Los cambios exhibidos por el riñón son enormemente acusados en ambos sentidos, por lo que no presentan ninguna significación estadística.

No obstante los inconvenientes señalados -inherentes a este tipo de experiencias-, se comprueba que a grandes rasgos los resultados obtenidos *in vivo* coinciden con los encontrados *in vitro*, demostrando que la T<sub>4</sub> ejerce un efecto estimulante del metabolismo del acetato en pollo cuando se ensaya en tratamientos no muy prolongados -3 días-, tanto en su oxidación a CO<sub>2</sub> como en su capacidad colesterogénica.

C.2.b.3. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato

Tampoco en las experiencias *in vivo* se observan cambios significativos en el metabolismo del mevalonato por la vía cetogénica, ya que la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de (R)-[5-<sup>14</sup>C] mevalonato presenta fuertes oscilaciones en ambos sentidos en todas las condiciones ensayadas, por lo que no puede deducirse un efecto claro, ni positivo ni negativo (Tabla 49).

Lo mismo puede argumentarse para la incorporación de mevalonato a insaponificables totales por parte del hígado y del riñón: los resultados obtenidos son muy variables, por lo que

Tratamiento	Producción de CO <sub>2</sub> en la respiración	Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón
10 µg , 3 días	0.917 (6)	1.691 (9) <sup>a</sup>	0.569 (6)*
10 µg , 7 días	1.313 (6)*	1.155 (9) <sup>a</sup>	1.802 (6)*
30 µg , 3 días	0.851 (3)	1.182 (3) <sup>a*</sup>	2.176 (3)*
30 µg , 7 días	1.076 (3)	1.151 (3)	1.219 (3)*
50 µg , 3 días	1.203 (6)	1.786 (9) <sup>a</sup>	0.575 (6)*
50 µg , 7 días	0.870 (6)	0.867 (9)	0.683 (6)*

TABLA 48. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato y en condiciones *in vivo*, en pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. <sup>a</sup> p<0.05

Tratamiento	Producción de CO <sub>2</sub> en la respiración	Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón
10 µg , 3 días	0.969 (3)	0.685 (3)*	1.150 (3)*
10 µg , 7 días	1.114 (3)	0.884 (3)*	0.710 (3)*
30 µg , 3 días	0.634 (3)*	0.832 (3)*	0.783 (3)*
30 µg , 7 días	1.200 (3)*	0.881 (3)*	1.082 (3)*
50 µg , 3 días	1.292 (3)*	0.731 (3)*	0.658 (3)*
50 µg , 7 días	1.251 (3)*	0.736 (3)*	0.681 (3)*

TABLA 49. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> en la respiración y de lípidos insaponificables totales a partir de mevalonato y en condiciones *in vivo*, en pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38.

parece conveniente continuar con los ensayos *in vivo* utilizando un mayor número de animales y, probablemente, comparando el comportamiento de animales machos con el de las hembras, así como diferentes edades y duración de los tratamientos.

### C.2.c. Estudios a nivel enzimático

Dada la importancia de la HMG CoA reductasa como enzima reguladora de la colesterogénesis a partir de acetato en muy diferentes situaciones fisiológicas (Siperstein, 1970; Rodwell y col., 1976; Dugan, 1981; Schroepfer, 1981 y 1982), así como en la regulación de la homeostasis del colesterol (Spady y col., 1985), se estimó oportuno iniciar en pollo el estudio de la posible influencia de las hormonas tiroideas sobre su actividad.

Asimismo, y teniendo en cuenta el papel propuesto para la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa como punto secundario de regulación de la colesterogénesis (Jabalquinto y Cardemil, 1980; Marco y col., 1983; Gonzalez-Pacanowska y col., 1985 y 1986), se amplió el estudio del efecto de la T<sub>4</sub> sobre esta enzima en pollo.

#### C.2.c.1. Efecto sobre la actividad HMG CoA reductasa

Se han determinado los niveles de actividad HMG CoA reductasa en hígado de animales de 15 días sometidos previamente durante 3 ó 7 días a una inyección diaria de 50 µg de T<sub>4</sub>. Como puede observarse en la Tabla 50, ninguno de los tratamientos ensayados produce un efecto significativo sobre la enzima de hígado. Dicho resultado parece no estar de acuerdo con el aumento experimentado en la incorporación de acetato a insaponificables totales por cortes de hígado después de 3 días de inyección de 10

Tratamiento	Actividad HMG-Co A reductasa	
	Hígado	Mucosa duodenal
50 µg , 3 días	0.894 (3)	1.940 (3) <sup>b</sup>
50 µg , 7 días	0.895 (3)	2.024 (3) <sup>a</sup>

TABLA 50. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la actividad HMG-Co A reductasa de pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en la Tabla 37. <sup>a</sup> p<0.001 <sup>b</sup> p<0.02

µg de T<sub>4</sub> o en las experiencias *in vivo* después de 3 días de la inyección de distintas dosis de la hormona. Sin embargo, resultados muy recientes de Amorosa y col. (1984) ponen de manifiesto una falta de correlación entre la respuesta de la incorporación de acetato a colesterol y la de la actividad HMG CoA reductasa, estudiada en cultivos de fibroblastos en diferentes medios. Incluso más recientemente (Field y col., 1986) se ha propuesto que los cambios observados en el metabolismo del colesterol en ratas hipotiroideas o en las mismas ratas tratadas con T<sub>4</sub> durante una semana no pueden explicar el incremento de los niveles de colesterol plasmático observados en el estado hipotiroideo, por lo que deben verse implicados otros factores tales como cambios en el catabolismo de las lipoproteínas que aún permanecen sin ser estudiados.

Un último aspecto merece ser destacado en este capítulo. En el trabajo de Field y col. (1986) citado, se ponía de manifiesto que la HMG CoA reductasa de intestino no se ve significativamente alterada en el hipotiroidismo, mientras que la administración de T<sub>4</sub> a ratas hipotiroideas produce un incremento muy fuerte en dicha actividad, que es muy superior al observado en la enzima de origen hepático. Teniendo en cuenta estos datos y con objeto de comprobar simultáneamente la idoneidad de los sistemas de ensayo utilizados, se ha estudiado el efecto de las mismas dosis de T<sub>4</sub> sobre la reductasa de mucosa duodenal de pollos de 15 días. Como se puede apreciar en la Tabla 50, tanto a los 3 como a los 7 días tiene lugar un aumento muy significativo en dicha actividad, lo que viene a confirmar la bondad del método de ensayo y plantea nuevas incógnitas para futuros trabajos sobre el papel de estas hormonas en el metabolismo del colesterol en intestino, tejido que contribuye de un modo importante a la síntesis y homeostasis de dicho compuesto, y cuya regulación se encuentra muy poco estudiada (Shefer y col., 1972; McIntyre e Isselbacker, 1973; Bochenek y Rodgers, 1979; Sugano y col., 1980)



C.2.c.2. Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa

Como ya se ha dicho anteriormente, a fin de poder establecer una cierta correlación entre la respuesta frente a las hormonas tiroideas de la incorporación del mevalonato a lípidos insaponificables y la actividad de alguna de las enzimas implicadas en su regulación, se estudió el efecto de la T<sub>4</sub> sobre la PPMVA descarboxilasa utilizando [1-<sup>14</sup>C]mevalonato como sustrato de la reacción. Las cantidades de 5-fosfomevalonato y de 5-pirofosfomevalonato -considerados como índice de las actividades mevalonato quinasa y fosfomevalonato quinasa- no muestran variaciones apreciables en ninguno de los casos estudiados, por lo que la cantidad de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producido puede considerarse como un índice apropiado para la expresión de la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa, sin necesidad de tener que utilizar PPMVA como sustrato específico de la reacción.

El estudio comparativo de los valores obtenidos en animales tratados frente a los controles se resume en la Tabla 51, donde puede apreciarse que no existen modificaciones significativas por efecto de ninguno de los tratamientos ensayados. Esta falta de influencia de la T<sub>4</sub> sobre la PPMVA descarboxilasa es semejante a lo observado en la incorporación de mevalonato a insaponificables totales, proceso que tampoco puede verse afectado por la inyección de dicha hormona ni *in vivo* ni *in vitro*.

Actividad PPMVA descarboxilasa		
Tratamiento	Hígado	Riñón
50 µg , 3 días	1.008 (4)	0.902 (4)
50 µg , 7 días	0.929 (3)	0.938 (3)

TABLA 51. Efecto de la T<sub>4</sub> sobre la actividad PPMVA descarboxilasa de pollos de 15 días. Los resultados se expresan como en la Tabla 37.

### C.3. TRATAMIENTO CON T<sub>3</sub>

Con objeto de completar una visión general acerca de la influencia del estado tiroideo sobre el metabolismo del acetato -y comparativamente del mevalonato- en pollo y dada la importante acción hormonal de la T<sub>3</sub>, se ha estudiado su posible efecto en los mismos parámetros analizados en anteriores ensayos, realizando las experiencias solamente en condiciones *in vitro* en vista de las enormes dificultades puestas de manifiesto en estudios hormonales *in vivo*.

#### C.3.a. Experiencias in vitro

Se han ensayado dos dosis diferentes de T<sub>3</sub>: 5 y 10 µg/100 g de peso y día, mediante inyección subcutánea llevada a cabo diariamente durante 7 días antes del sacrificio de los animales, el cual se efectuaba cuando éstos alcanzaron 15, 30 y 60 días de edad. Con ello se ha pretendido comprobar el efecto de las diferentes dosis sobre pollos de distintas edades, a fin de establecer las posibles consecuencias específicas para cada tipo de tratamiento.

##### C.3.a.1. Efecto sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones

Independientemente del lógico aumento de peso con la edad, el tratamiento con T<sub>3</sub> induce una disminución significativa del peso corporal en los animales más jóvenes -15 días- pero no parece afectar a los pollos de 30 ó 60 días (Tabla 52). Dicha disminución es más acusada cuando se suministra la mayor dosis (10 µg).

Dosis ( $\mu$ g)	Edad (días)	Peso corporal	Peso hígado	Peso riñones
5	15	0.947 (8) <sup>a</sup>	0.944 (8)	0.976 (8)
10	15	0.861 (8) <sup>a</sup>	0.894 (8)	0.945 (8)
5	30	0.992 (6)	0.906 (6) <sup>a</sup>	1.061 (6)
10	30	0.885 (6)	0.884 (6) <sup>a</sup>	0.929 (6)
5	60	1.154 (3)	1.182 (3)	1.058 (3)
10	60	0.831 (3)	0.907 (3)	1.018 (3)

TABLA 52. Efecto de la T<sub>3</sub> sobre el peso corporal, del hígado y de los riñones de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio para experiencias *in vitro*. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. <sup>a</sup> p<0.05

Por otra parte, el peso del hígado sólo parece disminuir significativamente en pollos de 30 días y a las dos dosis ensayadas, mientras que el peso de los riñones no se altera apreciablemente bajo ningún tratamiento.

C.3.a.2. Efecto sobre los niveles séricos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>

El tratamiento con T<sub>3</sub> produce un aumento muy significativo de los niveles séricos de dicha hormona (Tabla 53) a las tres edades ensayadas y para ambas dosis. Sin embargo, el incremento de T<sub>3</sub> observado en los pollos de 60 días es muy superior al experimentado por los pollos más jóvenes, lo cual puede estar relacionado con los cambios hormonales que acontecen durante el crecimiento de estos animales. En efecto, aunque los estudios sobre la evolución de los niveles de las hormonas tiroideas en pollo son fragmentarios y divergentes en muchos casos (Davison, 1976; Thommes y Hylka, 1977; Bacou y col., 1979), todo parece indicar que la T<sub>3</sub> es cualitativamente minoritaria respecto de la T<sub>4</sub> y que, mientras ésta no cambia significativamente entre las 3-9 semanas los niveles de T<sub>3</sub> experimentan un descenso del 50% aproximadamente (Chiasson y Combest, 1979).

Los resultados en pollos controles aquí expuestos coinciden, a grandes rasgos, con lo argumentado anteriormente, si bien los valores numéricos encontrados para la T<sub>4</sub> se asemejan más a los descritos por Bacou y col. (1979) que a los de Chiasson y Combest (1979). De cualquier forma, el hecho de que los niveles de T<sub>3</sub> tiendan a disminuir con la edad, puede explicar la mayor sensibilidad o respuesta frente a la inyección repetida de T<sub>3</sub> por parte de los pollos de 60 días. Asimismo, es de destacar que el efecto observado a cada edad es semejante para todas las dosis ensayadas.

Por otra parte, el tratamiento con T<sub>3</sub> determina una

Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Edad (días)	Niveles séricos de hormonas tiroideas	
		T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
5	15	2.014 (5) <sup>a</sup>	0.518 (5) <sup>b</sup>
10	15	2.497 (5) <sup>a</sup>	0.459 (5) <sup>b</sup>
5	30	1.501 (5) <sup>a</sup>	0.677 (4) <sup>b</sup>
10	30	1.588 (5) <sup>a</sup>	0.492 (4) <sup>b</sup>
5	60	6.379 (3) <sup>a</sup>	VND
10	60	5.406 (3) <sup>a</sup>	0.722 (3) <sup>c</sup>

TABLA 53. Efecto de la T<sub>3</sub> sobre los niveles séricos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio para experiencias *in vitro*. Los resultados se expresan como en la Tabla 37. <sup>a</sup> p<0.001 <sup>b</sup> p<0.005 <sup>c</sup> p<0.001 VND= valor no disponible

disminución significativa de los niveles séricos de  $T_4$ , que parece ser del mismo grado en las tres edades y para las diferentes dosis ensayadas. Resultados similares se obtuvieron en rata (Keyes y col., 1981) y revelan que el incremento en la concentración sérica de  $T_3$  produce una inhibición "feedback" de la síntesis endógena de hormonas tiroideas y, por tanto, el descenso de los niveles de  $T_4$ .

#### C.3.a.3. Efecto sobre el metabolismo del acetato

La inyección subcutánea de  $T_3$  durante 7 días no parece inducir cambios significativos en la capacidad oxidativa del acetato a  $CO_2$  a ninguna de las dosis ni edades ensayadas (Tabla 54). Sin embargo, en los pollos más jóvenes -15 días- el mismo tratamiento produce un aumento en la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales, aunque es estadísticamente significativo en los cortes de riñón pero no en los de hígado, debido a las variaciones numéricas observadas. La estimulación de la colesterogénesis a partir de acetato ya había sido puesta de manifiesto, como se vió anteriormente, hace bastantes años (Fletcher y Myant, 1958) en rata; sin embargo en pollo los estudios son mucho más recientes y parecen haberse limitado, en este aspecto, al aumento puesto de manifiesto en los niveles hepáticos de colesterol en animales de 3 días mediante una sola inyección de  $T_3$  (Perez-Lopez y col., 1984). Dicho aumento es máximo a las 12 horas de la inyección, anulándose al cabo de 24 horas. La dosis óptima de  $T_3$  parece establecerse en 8  $\mu g$ / animal, si bien dosis superiores presentan efectos prácticamente semejantes sobre la colesterolemia.

Estos hallazgos parecen demostrar una marcada diferencia entre pollo y rata, ya que en esta última especie el efecto colesterogénico de la  $T_3$  se mantiene mucho tiempo -hasta 80 horas- (Ness y col., 1973), mientras que en pollo desaparece rápidamente y se anula a las 24 horas de la inyección, lo cual

Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Edad (días)	Producción de $\text{CO}_2$		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
5	15	1.342 (3)	1.029 (3)	2.360 (3)*	1.220 (3) <sup>a</sup>
10	15	1.325 (3)	0.970 (3)	1.413 (3)*	1.648 (3) <sup>a</sup>
5	30	1.009 (3)	1.083 (3)	0.993 (3)	0.828 (3)
10	30	0.916 (3)	0.692 (3)*	1.131 (3)	1.041 (3) <sup>a</sup>
5	60	0.861 (3)	1.047 (3)	0.971 (3)	VND
10	60	0.740 (3)*	0.844 (3)	0.978 (3)	VND

TABLA 54. Efecto de la  $T_3$  sobre la producción de  $\text{CO}_2$  y de lípidos insaponificables totales a partir de acetato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RIÑON de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. \*  $p < 0.001$  VND= valores no disponibles



podría explicar la falta de una respuesta clara y contundente en las experiencias *in vitro* llevadas a cabo en este trabajo.

Por último, conviene destacar que la estimulación de la colesterogénesis sólo se observa en los estudios aquí reseñados en pollos relativamente jóvenes -15 días-, a una edad en que se acaban de instaurar los niveles de actividad HMG CoA reductasa hepática, que es prácticamente nula durante los primeros días después de la eclosión y sufre un fuerte incremento alrededor de la primera semana de vida (Alejandre y col., 1981). En este sentido, se ha descrito recientemente una marcada estimulación de la incorporación de acetato a colesterol en cultivos de fibroblastos, junto a un aumento más pequeño de la actividad reductasa (Amorosa y col., 1984).

#### C.3.a.4. Efecto sobre el metabolismo del mevalonato

Los resultados recogidos en la Tabla 55 ponen de manifiesto que la ruta cetogénica del mevalonato es incrementada significativamente por inyección de  $T_3$  -5  $\mu\text{g}/100$  g de peso y día- en pollos de 15 días, sin que se observe un efecto apreciable de ninguna de las otras condiciones ensayadas. Los cortes hepáticos tampoco parecen responder frente a la inyección de  $T_3$  en su actividad cetogénica. Estos resultados coinciden con los anteriormente expuestos sobre la acción de la  $T_4$  en experiencias realizadas también *in vitro* en pollos de 15 días, y parecen demostrar la importancia de la edad del animal en su respuesta frente a los tratamientos hormonales ensayados.

La incorporación de mevalonato a lípidos insaponificables totales no presenta tampoco variaciones significativas bajo ninguna de las condiciones experimentadas, tanto por cortes hepáticos como renales, si bien hay que recordar una vez más la discrepancia entre el comportamiento de ambos órganos frente a las hormonas del tiroides, habiéndose descrito

Dosis ( $\mu$ g)	Edad (días)	Producción de CO <sub>2</sub>		Incorporación a lípidos insaponificables totales	
		Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
5	15	1.050 (3)	2.302 (3) <sup>a</sup>	1.620 (3)*	1.079 (3)*
10	15	1.000 (3)	0.987 (3)	1.443 (3)*	1.208 (3)
5	30	0.625 (3)*	0.508 (3)*	1.115 (3)	0.674 (3)*
10	30	0.788 (3)	0.542 (3)*	0.495 (3)*	0.945 (3)
5	60	0.780 (3)	0.718 (3)*	1.009 (3)	0.620 (3)*
10	60	0.695 (3)*	0.542 (3)*	0.507 (3)*	0.772 (3)*

TABLA 55. Efecto de la T<sub>3</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> y de lípidos insaponificables totales a partir de mevalonato y en condiciones *in vitro*, por CORTES DE HIGADO y DE RIÑÓN de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38. <sup>a</sup> p<0.01

una respuesta positiva del riñón pero no del hígado (Feingold y col., 1980a) y viceversa (Gnoni y col., 1980).

C.3.b. Estudios a nivel enzimático

C.3.b.1. Efecto sobre la HMG CoA reductasa

A la vista de los resultados obtenidos en experiencias *in vitro* respecto al efecto de la inyección de  $T_3$  sobre el metabolismo del acetato, se ha procedido al estudio de la posible influencia de dicha hormona sobre la actividad HMG CoA reductasa, la cual experimenta un descenso del 50% en hígado de ratas hechas hipotiroideas (Guder y col., 1968) y un incremento de 3-4 veces los valores normales mediante la inyección de  $T_3$  (Ness y col., 1973), mostrando asimismo un período de latencia variable del orden de las 30 horas (Huber y col., 1974). Dicho comportamiento parece indicar que la estimulación de la reductasa por  $T_3$  se debe a un proceso de inducción de la síntesis *de novo* de la proteína enzimática, si bien -como ya se ha mencionado anteriormente- el mecanismo de acción hormonal parece depender de la dosis ensayada.

Los resultados que se han obtenido en esta experiencia se presentan en la Tabla 56, donde puede apreciarse que -contrariamente a lo esperado de acuerdo con la bibliografía- la enzima de origen hepático no presenta variaciones significativas en su actividad bajo ninguno de los tratamientos ensayados. Simultáneamente a la realización de la presente Memoria se ha publicado un trabajo (Perez-Lopez y col., 1984), en el que la actividad reductasa de pollos de 3 días aparece aumentada después de 12 horas de una única inyección de 8  $\mu\text{g}$  de  $T_3$ . Este resultado es aparentemente contrario a los aquí presentados; sin embargo,

Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Edad (días)	Actividad HMG-Co A reductasa Hígado
5	15	1.034 (3)*
10	15	1.027 (3)
5	30	1.093 (3)*
10	30	0.857 (3)
5	60	0.960 (3)
10	60	1.107 (3)

TABLA 56. Efecto de la  $T_3$  sobre la actividad HMG-Co A reductasa de hígado de pollos inyectados durante 7 días antes de su sacrificio. Los resultados se expresan como en las Tablas 37 y 38.

los mismos autores demostraron que a partir de 12 horas disminuye la diferencia entre la respuesta a la inyección de  $T_3$  frente a los controles, y -considerando el período de latencia previamente observado para la estimulación por dicha hormona de la síntesis proteica en pollo (Arrondo y col., 1978)- sugieren que el efecto colesterogénico de la  $T_3$  puesto de manifiesto a las 12 horas sería dependiente de dicha síntesis proteica. Dado que en la experiencia realizada se ha ensayado la actividad reductasa después de transcurridas aproximadamente 24 horas desde la última inyección, la falta de efecto observado podría explicarse por la propia disminución o caída de la acción hormonal.

Por otra parte, muy recientemente (Sample y col., 1987) se ha estudiado la relación entre el efecto de la  $T_3$  sobre la actividad HMG CoA reductasa, la cantidad de holoenzima de peso molecular 97,000 y la de su correspondiente mRNA, sugiriéndose que la  $T_3$  puede ejercer su efecto de una manera indirecta, disminuyendo los niveles de metabolitos derivados del mevalonato, que actúan a su vez como inhibidores de la reductasa. Entre estos compuestos se encuentran ciertos esteroides oxigenados (Kandutsch y col., 1978), oxiesteroles derivados del escualeno 2,3-epóxido (Panini y col., 1984), así como los denominados en estos trabajos lípidos insaponificables polares y que, tal y como mencionamos en su momento, han sido identificados como derivados del lanosterol y precursores -por tanto- del colesterol. Estos compuestos inhiben la HMG CoA reductasa (Aguilera y col., 1987b), por lo que cumplen con los condicionantes requeridos para poder actuar como intermediarios en la regulación hormonal de la colesterogénesis.

Todas estas consideraciones dejan abierto un ancho campo de investigación futura, uno de cuyos aspectos más interesantes podría ser el establecimiento de la posible influencia de las hormonas tiroideas sobre la producción de cada una de las fracciones de lípidos insaponificables -sintetizados tanto a

partir de acetato como de mevalonato-, especialmente los derivados polares del lanosterol, que pueden mediatizar -como ya se ha visto- el efecto de la T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> sobre la HMG CoA reductasa y, posiblemente, sobre otras enzimas que muestran un comportamiento semejante en la regulación de la colesterogénesis.



**VI. CONCLUSIONES**





PRIMERA.

En experiencias *in vivo*, la cantidad de CO<sub>2</sub> producido en la respiración a partir de acetato en pollos de 15 días, es proporcional a la dosis de sustrato inyectada y máxima a los 120 minutos después de la inyección, representando este valor máximo cerca del 50% de la dosis inyectada.

En estas condiciones, la máxima incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales ocurre en el hígado, seguido a distancia por la mucosa duodenal, el cerebro y los riñones.

SEGUNDA.

En el hígado, el colesterol representa más del 90% de los lípidos insaponificables formados, independientemente de la dosis de acetato inyectada (2-20  $\mu$ moles) y entre 15 y 240 minutos después de la inyección. Si la determinación se realiza al cabo de 12 horas, el porcentaje de colesterol disminuye a alrededor del 75%. En la mayoría de las condiciones ensayadas, aparecen pequeñas concentraciones de escualeno, óxido(s) de escualeno, lanosterol y una fracción de insaponificables polares que se han identificado como derivados del lanosterol y precursores del colesterol.

Tanto en mucosa duodenal como en riñón, el porcentaje de colesterol sintetizado *in vivo* se incrementa fuertemente a medida que lo hace la dosis de acetato inyectada, llegando a ser próximo al 100% para valores de 15-20  $\mu$ moles de sustrato. En ambos tejidos,

prácticamente el resto de la radiactividad procedente del acetato aparece en la fracción de derivados polares del lanosterol.

Algo semejante ocurre en cerebro, si bien en este caso parecen observarse pequeñas proporciones de lanosterol cuando se ensayan elevadas dosis de acetato (15-20  $\mu$ moles) durante cortos períodos de tiempo (15-30 minutos).

#### TERCERA.

La producción de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato *in vivo* en pollos de 15 días presenta un claro ritmo diurno, observándose un máximo hacia la mitad del período de luz y un mínimo ligeramente desplazado de la mitad del período de oscuridad. Variaciones similares presenta la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en hígado y -aunque algo menos acusadas- en mucosa duodenal, mientras que ni en riñón ni en cerebro aparecen diferencias significativas a las distintas horas ensayadas.

En pollos recién nacidos, no se observan cambios significativos en ambos procesos metabólicos en las mismas condiciones.

#### CUARTA.

Los porcentajes relativos de colesterol y de derivados polares de lanosterol obtenidos en hígado sólo presentan pequeñas variaciones diurnas, si bien dichos cambios acontecen siempre en sentido inverso,

observándose a las 6.00 a.m. -y coincidiendo con el mínimo de insaponificables totales- un mínimo de colesterol y un máximo de derivados de lanosterol.

En mucosa duodenal y riñón las variaciones de los porcentajes de ambas fracciones son mucho más acusadas, presentando el colesterol perfiles semejantes a los exhibidos por los insaponificables totales, mientras que los derivados polares del lanosterol cambian en sentido inverso.

En cerebro no se aprecian diferencias significativas a lo largo del día en ninguna de las fracciones obtenidas.

#### QUINTA.

De entre los 12 tejidos estudiados en las condiciones óptimas antes establecidas, la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales -expresada por g de tejido- es máxima en testículos e hígado, seguidos por páncreas, médula espinal y mucosa duodenal. Considerando el peso total del órgano, la producción de insaponificables en hígado es muy superior a la obtenida en el resto de los casos.

#### SEXTA.

En experiencias *in vitro*, la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato es mayor en cortes de riñón que en cortes de hígado o en raspado de mucosa duodenal, aumentando en todos los casos con la concentración de sustrato utilizado (1-12 mM) y el tiempo de incubación

ensayado (15-120 minutos).

Sin embargo, y en las mismas condiciones *in vitro*, la incorporación a insaponificables totales es mayor en cortes de hígado que en los de riñón o en raspado de mucosa duodenal.

#### SEPTIMA.

El colesterol es el principal insaponificable sintetizado en condiciones *in vitro* por cortes de hígado, independientemente de la concentración de acetato o del tiempo de incubación ensayados, si bien su porcentaje (54-57%) es muy inferior al observado *in vivo* (más del 90%. En cambio, los derivados polares del lanosterol representan un 37-39% del total, porcentaje muy superior al obtenido en condiciones *in vivo*.

En cortes de riñón y raspado de mucosa duodenal, la distribución de radiactividad en las diferentes fracciones insaponificables no parece depender del tiempo de reacción y sí de la concentración de acetato ensayada, siendo también el porcentaje de colesterol -en términos generales- inferior al sintetizado en experiencias *in vivo* y aumentando considerablemente la proporción de derivados polares del lanosterol.

#### OCTAVA.

La inyección de 1 mg de PTU/100 g de peso y día durante 5, 7 ó 10 días en pollos de distintas edades (11, 15, 30 y 60 días en el momento de su sacrificio),

no afecta significativamente al peso corporal, del hígado y de los riñones de los animales tratados respecto de sus controles.

Del mismo modo, tampoco disminuyen los niveles séricos de  $T_3$  y  $T_4$  como consecuencia de ninguno de los tratamientos ensayados -incluso la  $T_3$  aumenta-, por lo que no pueden considerarse como hipotiroideos los animales sometidos a dichos tratamientos.

Los cortes hepáticos y renales de pollos tratados con PTU en las mismas condiciones, no presentan variaciones significativas frente a los controles en el metabolismo *in vitro* del acetato, tanto respecto a su oxidación a  $CO_2$  como a su incorporación a lípidos insaponificables totales. En cambio, la producción de  $CO_2$  en la respiración aumenta ligera pero significativamente en pollos de 15 días de edad sometidos a inyección de PTU durante 5 ó 10 días.

Comparativamente, el metabolismo del mevalonato por la ruta cetogénica parece disminuir de forma significativa -en especial en cortes de riñón y en pollos más jóvenes-, mientras que los cambios observados en su incorporación a insaponificables totales no presentan significación estadística.

#### NOVENA.

La inyección de diferentes dosis de  $T_4$  (10, 30 ó 50  $\mu g/100$  g de peso y día) durante 3 ó 7 días, no afecta de una manera clara al peso de los pollos de 15 días ni al de sus hígados o riñones.

Tanto la producción de CO<sub>2</sub> como la de lípidos insaponificables totales a partir de acetato por cortes hepáticos, aumentan significativamente al cabo de 3 días de la inyección de 10 µg de T<sub>4</sub>. También la producción de insaponificables totales por el hígado en condiciones *in vivo*, aumenta significativamente después de 3 días de inyección de 10, 30 ó 50 µg de T<sub>4</sub>.

Los mismos tratamientos cortos -3 días- producen un aumento en la utilización del mevalonato por el desvío cetogénico en cortes de riñón, sin que sean significativos los cambios originados en la incorporación de dicho sustrato a lípidos insaponificables totales ni en hígado ni en riñón, tanto en experiencias llevadas a cabo *in vitro* como *in vivo*.

#### DECIMA.

Las actividades HMG CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa hepáticas no se modifican sensiblemente tras la inyección en pollos con 15 días de edad de 50 µg de T<sub>4</sub>/100 g de peso y día, durante 3 ó 7 días.

Sin embargo, la reductasa de mucosa duodenal sí resulta significativamente incrementada en las mismas condiciones.

#### DECIMOPRIMERA.

La inyección durante 1 semana de 5 ó 10 µg de T<sub>3</sub>/100 g de peso y día en pollos sacrificados a los 15, 30 ó 60 días de edad, no origina grandes cambios en los pesos corporales, si bien parecen disminuir ligeramente

en el caso de los animales más jóvenes tratados con mayor dosis de hormona.

Los niveles séricos de  $T_3$  aumentan considerablemente en todos los tratamientos ensayados, sobre todo en pollos de mayor edad (60 días), cuyos valores en los controles experimentan un descenso muy acusado. Los mismos tratamientos determinan una marcada disminución de los niveles séricos de  $T_4$ .

La oxidación de acetato a  $CO_2$  no se ve afectada por la inyección de  $T_3$  en cortes hepáticos ni renales, si bien la incorporación a lípidos insaponificables totales parece aumentar en los animales más jóvenes, y de un modo más significativo en cortes de riñón.

La ruta cetogénica del mevalonato se incrementa en cortes de riñón de pollos de 15 días, mientras que ningún tratamiento con  $T_3$  afecta a la síntesis de insaponificables totales a partir de dicho sustrato.

#### DECIMOSEGUNDA.

En las condiciones ensayadas, la inyección de  $T_3$  no modifica significativamente los niveles de actividad HMG CoA reductasa hepática.





VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



ACKERMAN M.E., REDD W.L. y SCALLEN T.J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 29-35

AGUILERA J.A. (1985) *Tesis doctoral*. Universidad de Granada.

AGUILERA J.A., GARCIA-MOLINA V., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1987b) *FEBS Lett.* (en prensa)

AGUILERA J.A., GARCIA-MOLINA V., LINARES A., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1987a) *Biochem. Int.* 14, 375-383

AGUILERA J.A., LINARES A., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 617-621

AGUILERA J.A., LINARES A., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1983) *Int. J. Biochem.* 15, 1481-1484

AGUILERA J.A., LINARES A., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1984a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 945-948

AGUILERA J.A., LINARES A., MARCO C., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1984b) *Ann. Nutr. Metab.* 28, 342-349

ALEJANDRE M.J., RAMIREZ H., LINARES A. y GARCIA-PEREGRIN E. (1983) *Int. J. Biochem.* 15, 1077

- ALEJANDRE M.J., RAMIREZ H., SEGOVIA J.L. y GARCIA-PEREGRIN E.  
(1985a) *Ann. Nutr. Metab.* 29, 111-118
- ALEJANDRE M.J., RAMIREZ H., SUAREZ M.D. y GARCIA-PEREGRIN E.  
(1981) *Biol. Neonate* 40, 232-236
- ALEJANDRE M.J., ZAFRA M.F., RAMIREZ H., SEGOVIA J.L. y GARCIA-PEREGRIN E. (1985 b) *Int. J. Biochem.* 17, 835-838
- AMOROSA L.F., KACHADURIAN A.K., HARRIS J.N., SCHNEIDER S.H. y FUNG C.H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 792, 192-198
- ANDERSEN J.M. y DIETSCHY J.M. (1979) *J. Lipid Res.* 20, 740-752
- ARRONDO J.L.R., SANCHO M.J. y MACARULLA J.M. (1978) *Experientia* 34, 1099-1100
- BACK P., HAMPRECH T. y LYNEN F. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21
- BACOU F., JALLAGEAS M., NOUGUES J. y VIGNERON P. (1979) *C. R. Acad. Sc. Paris* 288D, 1603-1605
- BARKER S.B. (1951) *Amer. Physiol. Soc.* 31, 205-243
- BARNES D. y SATO G. (1980) *Cell* 22, 649-655
- BEG Z.H., STONIK J.A. y BREWER H.B.Jr. (1977) *FEBS Lett.* 80, 123-129
- BHAT C.S. y RAMASARMA T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-788
- BELL F.P. (1976) *Exp. Mol. Pathol.* 25, 279-292

- BELL G.H., DAVIDSON J.N. y SCARBOROUGH H. (1963) En *Physiology and Biochemistry* Livingstone ed. Edinburgh y London
- BELL J.J., SARGEANT T.E. y WATSON J.A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1745
- BERGSTROM J.O., WONG G.A., EDWARDS P.A. y EDMOND J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14548-14553
- BEYTIA E.D. y PORTER J.W. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 113-142
- BHAT C.S. y RAMASARMA T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-788
- BHAT C.S. y RAMASARMA T. (1979) *Biochem. J.* 181, 143-151
- BLAISSDELL R. y WATSON J.A. (1981) *Atherosclerosis* 1, 70-71
- BLOCH K., BERG B.N. y RITTENBERG D. (1943) *J. Biol. Chem.* 149, 511-517
- BLOCH K., BOREK E. y RITTENBERG D. (1946) *J. Biol. Chem.* 162, 441-449
- BLOCH K. y RITTENBERG D. (1942) *J. Biol. Chem.* 145, 625-636
- BOCHENEK W.J. y RODGERS J.B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 575, 57-62
- BOOTH R., GREGORY K.W. y SMITH C.Z. (1972) *Biochem. J.* 130, 72-73P
- BORTZ W.M. (1973) *Metab. Clin. Exp.* 22, 1507-1524
- BORTZ W.M. y STEELE L. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 306, 85

- BORTZ W.M., STEELE L., ARKENS L. y GRUNDHOFER B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 316, 366-377
- BOUCEK R.J. y SAVARD K. (1970) *Gen. Comp. Endocrinol.* 15, 6-11
- BOYD G.S. (1959) En *Hormonas and Atherosclerosis*. G.Pincus, ed. pp.49-62 Academic Press. N.Y.
- BOYD G.S. y OLIVER M.F. (1960) *J. Endocrinol.* 21, 25
- BRADY S.P., SCOFIELD R.F. y LANDAU B.R. (1983) *J. Lipid Res.* 24, 1168
- BROWN M.S., DANA S.E. y GOLDSTEIN J.L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2162-2166
- BROWN M.S., DANA S.E. y GOLDSTEIN J.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4025
- BROWN M.S. y GOLDSTEIN J.L. (1976) *Science* 191, 150
- BROWN M.S. y GOLDSTEIN J.L. (1980) *J. Lipid Res.* 21, 505
- BROWN K., HAVEL C.M. y WATSON J.A. (1985) *J. Biol. Chem.* 258, 8512-8518
- BUCHER N.L.R. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 498
- BUCHER N.L.R., MCGARRAHAN K., GOULD E. y LOUD A.V. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 262-267
- BYERS S.O., ROSENMAN R.H., FRIEDMAN M. y BIGGS M.W. (1952) *J. Exp. Med.* 96, 513-516
- CHAIKOFF I.L., ENTENMAN C., CHANGUS G.W. y REICHERT F.L. (1941)

*Endocrinology* 28, 797-805

- CHANG T.Y. (1983) En *The Enzymes* Boyer ed. tomo XVI pp.492
- CHANG T.Y. y LIMANEK J.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7785
- CHANG T.Y. y LIMANEK J.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6174
- CHEN H.W., CAVENEE W.K. y KANDUTSCH A.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 715
- CHEVALLIER F. (1956a) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 42, 633-641
- CHEVALLIER F. (1956b) *Arch. Sci. Physiol.* 10, 249-275
- CHEVALLIER F. (1956c) *Arch. Sci. Physiol.* 10, 321-336
- CHEVALLIER F. (1963) *Ann. Nutr. Aliment.* 17, 51-57
- CHEVALLIER F. (1967) En *Advances in Lipid Research* Paoletti ed. vol. V pp.209-230 Academic Press N.Y.
- CHEVALLIER F. y LUTTON C. (1966) *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 48, 507-523
- CHEVALLIER F. y LUTTON C. (1973) *Nature New Biol.* 242, 61-62
- CHEVALLIER F. y MAGOT T. (1975) *Experientia (Basel)* 31, 627-629
- CHEVALLIER F. y MATHE D. *Path. Biol.* 24, 377-381
- CHIASSON R.B. y COMBEST W.L. (1979) *Life Sci.* 25, 1551-1556
- CHIN D.J., GIL G., FAUST J.R., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. y LUSKEY K.L. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 634



- CLINKENBEARD K., REED W.D., MOONEY R.A. y LANE M.D. (1975a) *J. Biol. Chem.* 250, 3108-3116
- CLINKENBEARD K., SUGIYAMA D.T., REED W.D. y LANE M.D. (1975b) *J. Biol. Chem.* 250, 3124-3135
- COOPER D.S., KIEFFER J.D., HALPERN R., SAXE V., MOVER H., MALOOF F. y RIDGWAY E.C. (1983) *Endocrinology* 113, 921-928
- DAVISON T.F. (1976) *Gen. Comp. Endocrinol.* 29, 21-27
- DAWBER T.R., KANNEL W.B., REVOTSKIE N. y KAGAN A. (1962) *Proc. R. Soc. Med.* 55, 265-271
- DAYTON S., DAYTON J., DRIMMER F. y KENDALL F.E. (1954) *Circulation* 10, 595
- DECKER K. y BARTH Ch. (1973) *Mol. Cell. Biochem.* 2, 179-188
- DEISS W.P., ALBRIGHT E.C. y LARSON F.C. (1953) *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 84, 513
- DE ROBERTIS E. y GRASSO R. (1946) *Endocrinology* 38, 137
- DE ROBERTIS E. y NOWINSKI W.W. (1946) *J. Clin. Endocrinol.* 6, 235
- D'HOLLANDER F. y CHEVALLIER F. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 733-744
- DIETSCHY J.M. y BROWN M.S. (1974) *J. Lipid Res.* 15, 508-516
- DIETSCHY J.M. y MCGARRY J.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 52-58
- DIETSCHY J.M. y SIPERSTEIN M.D. (1967) *J. Lipid Res.* 8, 97-104
- DOLPHIN P.J. (1981) *J. Lipid Res.* 22, 971-989

- DIETSCHY J.M. y WILSON J.D. (1968) *J. Clin. Invest.* 47, 166-174
- DUGAN R.E. (1981) En *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, ed. por J.W. Porter y S.L. Spurgeon, vol. 1 pp. 95-159 Wiley, N.Y.
- DUGAN R.E., NESS G.C., LAKSHMANAN M.R., NEPOKROEFF C.M. y PORTER J.W. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 499-504
- DUGAN R.E. y PORTER J.W. (1976) En "The enzymes of biological membranes" A. Martonosi Ed. Vol.2 p.161-206 Plenum Press, New York
- DUGAN R.E., SLAKEY L.L., BRIEDIS A.B. y PORTER J.W. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 21-27
- DURR I.F. (1968) *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 663-671
- DURR I.F. y MURAD M. (1971) *Int. J. Biochem.* 2, 249-252
- EDGREN B. y HELLSTRÖM K. (1972) *Acta Physiol. Scand.* 86, 250-256
- EDMOND J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 72-80
- EDMOND J., FOGELMAN A., POPJAK G. y ROECKER B. (1975)
- EDMOND J. y POPJAK G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 66-71
- EDWARDS P.A. y GOULD R.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2891
- EDWARDS P.A., LAU S.F., TANAKA R.D. y FOGELMAN A.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7272
- EDWARDS P.A., MUROYA H. y GOULD R.G. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 396

- ERICKSON S.K., SHREWSBURY M.A., GOLD R.G. y COOPER A.D. (1980)  
*Biochem. Biophys. Acta* 620, 70-79
- ESKELSON C.D., CAZEE C.R., ANTHONY W., TOWNE J.C. y WALSKE B.R.  
(1970) *J. Med. Chem.* 13, 215-220
- EVANS A.J. (1972) *Br. Poult. Sci.* 13, 595-602
- FAUST J.P., LUSKEY K.L., CHIN D.J., GOLDSTEIN J.L. y BROWN M.S.  
(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 79, 5205
- FAVARGER P. (1965) *Am. Physiol. Soc.* 19
- FEINGOLD K.R., WILEY M.H., MaC RAE G. y SIPERSTEIN M.D. (1980a)  
*J. Clin. Invest.* 66, 646-654
- FEINGOLD K.R., WILEY M.H., SEARLE G.L., MACHIDA B.K. y SIPERSTEIN  
M.D. (1980b) *J. Clin. Invest.* 66, 361-366
- FIELD F.J., ALBRIGHT E. y MATHUR S.N. (1986) *Metabolism* 35, 1085-  
1089
- FIELDS E.M. (1957) *J.A.M.A.* 163, 817
- FLETCHER K. y MYANT N.B. (1958) *J. Physiol.* 144, 361-372
- FLETCHER K. y MYANT N.B. (1960) *J. Physiol.* 154, 145-152
- FLETCHER K. y MYANT N.B. (1961) *J. Physiol.* 157, 542-564
- FOGELMAN A.M., EDMOND J. y POPJAK G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250,  
1771
- GALLI F.E., IRUSTA O. y WASSERMAN G.F. (1975) *Acta Phys. Lat.  
Amer.* 25, 60-66

GALTON D.J. (1968) *J. Lipid Res.* 9, 19-26

GANONG W.F. (1965) En *Medical Physiology* Blackwell Scientific Publications Oxford

GANS J.H., BLOCK A.J. y CARTER M.R. (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 609-612

GARCIA-MARTINEZ J., SEGOVIA J.L., SUAREZ M.D. y GARCIA-PEREGRIN E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 202-208

GIBSON W.R. y NALBANDOV A.V. (1966) *Am. J. Physiol.* 211, 1352-1356

GIL G., FAUST J.R., CHIN D.J., BROWN M.S. y GOLDSTEIN J.L. (1985) *Cell* (Cambridge, Mass.) 41, 249

GNONI G.J., LANDRISCINA C. y QUAGLIARIELLO E. (1980) *Biochem. Med.* 24, 336-347

GODFREY J.C., LUTTINGER J.R., TAYLOR H.D. y SANHYEZA G.M. (1976) *Nutr. Rep. Int.* 13, 263-271

GOLDSTEIN J.L. y BROWN M.S. (1983) *Clin. Res.* 30, 417-426

GONZALEZ-PACANOWSKA D., AGUILERA J.A., ARCE V., GARCIA-MARTINEZ J., LINARES A. y GARCIA-PEREGRIN E. (1985) *Int. J. Biochem.* 17, 275-278

GONZALEZ-PACANOWSKA D., MARCO C., GARCIA-MARTINEZ J. y GARCIA-PEREGRIN E. (1984) *Int. J. Biochem.* 16, 845-847

GONZALEZ-PACANOWSKA D., MARCO C., GARCIA-MARTINEZ J. y GARCIA-PEREGRIN E. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 833, 449-455

- GONZALEZ-PACANOWSKA D., MARCO C., GARCIA-MARTINEZ J. y GARCIA-PEREGRIN E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 875, 605-609
- GOODRIDGE A.G. (1968) *Biochem. J.* 108, 655-661
- GOODRIDGE A.G. y BALL E.G. (1966) *Am. J. Physiol.* 211, 803-808
- GOODRIDGE A.G. y BALL E.G. (1967) *Am. J. Physiol.* 213, 245-249
- GOULD R.G. (1959) En *Hormones and Atherosclerosis* Pincus ed. pp.75-88 Academic Press N.Y.
- GOULD R.G. (1977) En *Cholesterol Metabolism and Lipolytic Enzymes* Polonowsky ed. pp.13-18 Masson Inc. France
- GOULD R.G. y COOK R.P. (1958) En *Cholesterol* Cook ed. pp. 237-307 Acad. Press N.Y.
- GOULD R.G. y SWYRYD E.A. (1966) *J. Lipid Res.* 7, 698-707
- GOULD R.G. y TAYLOR C.B. (1950) *Fed. Proc.* 9, 179
- GRANDGEORGE M., DUPERRAY B. y PACHECO H. (1977) *J. Pharmacol.* 8, 297-314
- GREENE R., PEARCE J.F. y RIDEOUT D.F. (1961) *Brit. M.J.* 1, 1572
- GREGORY K.W., SMITH C.Z. y BOOTH R. (1972) *Biochem. J.* 130, 1163-1165
- GRIES F.A., MATSCHINSKY F. y WIELAND O. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 56, 615-617
- GRIES F.A., MATSCHINSKY F. y WIELAND O. (1963) *Symp. Dsch. Ges. Endokrinol.* 9, 149-152

- GROLLMAN A. (1965) *En Pharmacology and Therapeutics* Lea & Febiger ed. Philadelphia
- GROSS J. y PITT-RIVERS R. (1952) *Lancet* 1, 439
- GROSS J. y PITT-RIVERS R. (1953a) *Biochem. J.* 53, 645
- GROSS J. y PITT-RIVERS R. (1953b) *Biochem. J.* 53, 652
- GUDER W., NOLTE I. y WIELAND O. (1968) *Eur. J. Biochem.* 4, 273-278
- HAGERMANN J.S. y GOULD R.G. (1951) *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 78, 329-332
- HAHN P. (1986) *Biol. Neonate* 50, 259-264
- HAM R.G. y MCKEENHAN W.C. (1978) *In vitro* 14, 11-22
- HAMPRECHT H., NÜSSLER C. y LYNEN F. (1969) *FEBS Lett.* 4, 117-121
- HANDLER P. (1948) *J. Biol. Chem.* 173, 295-303
- HAVEL C.M., RECTOR E.R. y WATSON J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 10150-10156
- HELLER R.A. y GOULD R.G. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 859-865
- HELLER R.A. y GOULD R.G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 254-259
- HELLSTRÖM K.H., SIPERSTEIN M.D., BRICKER L.A. y LUBY L.J. (1973) *J. Clin. Invest.* 52, 1303-1313

- HICKMAN P.E., NORTON B.J. y SABINE J.R. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 17-22
- HOCH F.L. (1962) *Physiol. Rev.* 92, 605-673
- HOCH F.L. y LIPMANN F. (1953) *Amer. Soc. Biol. Chem.* 12, 718
- HUBER J., GUDER W., MILLER O.A., LATZIN S., GANSER H. y HAMPRECHT B. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 669-674
- HUBER J., LATZIN S., LANGGUTH O., BRAUSER B., GABEL V.P. y HAMPRECHT B. (1973) *FEBS Lett.* 31, 261-265
- HWANG E.C., GRIMMINGER P. y FISHER H. (1975a) *Nutr. Rep. Int.* 11, 185-191
- HWANG E.C., GRIMMINGER P. y FISHER H. (1975b) *Nutr. Rep. Int.* 11, 193-198
- INGBAR S.H. y WOEBER K.A. (1967) En *Textbook of Endocrinology* W.B. Saunders Co. 4ª ed. Philadelphia
- JABALQUINTO A.M. y CARDEMIL E. (1980) *Lipids* 15, 196-199
- JOHNSON R.C. y SHAH S.N. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 502-510
- JOHNSON R.C. y SHAH S.N. (1977) *Lipids* 9, 962-970
- KACIUBA-USCILKO, H. y BRZEZINSKA Z. (1973) *Experientia* 30, 256
- KALLIECHARAN R. y HALL B.K. (1974) *Gen. Comp. Endocrinol.* 24, 364-372
- KALLIECHARAN R. y HALL B.K. (1976) *Gen. Comp. Endocrinol.* 30,

539-540

- KANDUTSCH A.A., CHEN H.W. y HEINIGER H.J. (1978) *Science* 201, 498
- KANDUTSCH A.A. y SAUCIER S.E. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2299-2305
- KARP A. y STETTEN D. (1949) *J. Biol. Chem.* 179, 819-830
- KAWACHI T. y RUDNEY H. (1970) *Biochemistry* 9, 1700-1705
- KEELE C.A. y NEIL E. (1965) En *Samson Wrigh't Applied Physiology* 11ª ed. Oxford University Press London
- KENDALL E.C. (1917) *J. Biol. Chem.* 29, XXIX
- KEYES W.G., WILCOX H.G. y HEINBERG M. (1981) *Metabolism* 30, 135-146
- KHACHADURIAN A.K. (1969) *Lancet* 2, 778-780
- KILSHEIMER G.S., WEBER D.R. y ASHMORE J. (1960) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 515-518
- KING H.L.Jr. y RILLING H.C. (1977) *Biochemistry* 16, 3815-3819
- KLEBANOFF S.J. (1965) En *Physiology and Biochemistry* W.B. Saunders 19ª ed. p.1147 Philadelphia
- KRITCHEVSKY D. (1958) En *Cholesterol* Wiley Sons ed. N.Y.
- KRITCHEVSKY D. (1960) *Metab. Clin. Exp.* 9, 984-994
- KRUL E.S. y DOLPHIN P.J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 713, 609-621



- KURODA M. y ENDO A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 468, 70-81
- LEREN P. (1966) *Acta Med. Scand. Suppl.* 466, 1-92
- LEVEILLE G.A. (1966) *J. Nutr.* 90, 449-460
- LEVEILLE G.A. (1967) *J. Nutr.* 98, 367-372
- LEVEILLE G.A., O'HEA E.K. y CHAKRABARTY (1968) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 398-401
- LEVEILLE G.A., ROMSOS D.R., YEH Y.Y. y O'HEA E.K. (1975) *Poultry Sc.* 54, 1075-1093
- LIEPA G.V., BEITZ D.C. y LINDER J.R. (1978) *J. Nutr.* 108, 535-543
- LINARES A., AGUILERA J.A., ARCE V. y GARCIA-PEREGRIN E. (1983) *Int. J. Biochem.* 15, 1477-1480
- LINARES A., GARCIA-MARTINEZ J., SUAREZ M.D. y GARCIA-PEREGRIN E. (1980) *Biol. Neonate* 38, 25
- LUSKEY K.L., FAUST J.R., CHIN D.J., BROWN M.S. y GOLDSTEIN J.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8462
- LUTTON C. (1976) *Digestion* 14, 342-356
- LUTTON C. y CHEVALLIER F. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255, 762-777
- LUTTON C. y CHEVALLIER F. (1976) *Biomedicine*
- MALAMUD D. y PERRIN L. (1974) *Endocrinology* 94, 1157-1159

- MANN W., LEBLOND C.P. y WARREN S.L. (1942) *J. Biol. Chem.* 142, 905
- MARCO C., GONZALEZ-PACANOWSKA D. y GARCIA-PEREGRIN E. (1986) *Int. J. Devl. Neuroscience* 4, 445-450
- MARCO C., GONZALEZ-PACANOWSKA D., LINARES A. y GARCIA-PEREGRIN E. (1983) *Neurochem. Res.* 8, 711-721
- MARCO C., MORILLAS L.G. y GARCIA-PEREGRIN E. (1986a) *Biochim. Biophys. Acta* 875, 599-604
- MARCO C., MORILLAS L.G., SEGOVIA J.L. y GARCIA-PEREGRIN E. (1986b) *Int. J. Biochem.* 18, 223-227
- MARCO C., RAMIREZ H., GONZALEZ-PACANOWSKA D. y GARCIA-PEREGRIN E. (1985) *Neurochem. Int.* 7, 131-135
- MARX W., GUSTIN S.T. y LEVI C. (1953) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 143-146
- MATHE D. y CHEVALLIER F. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441, 155-164
- MATHE D. y CHEVALLIER F. (1980) *Digestion* 20, 121-126
- McINTYRE J.M. e IESELBACKER K.J. (1973) *Amer. J. Clin. Nutr.* 26, 647-656
- McLEOD M.G. y JEWITT T.R. (1984)
- McNAMARA D., AHRENS E.H.J., PARKER T.S. y MORRISSEY K. (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 31-39
- MITROPOULOS K.A., GIBBONS G.F., CONNELL C.M. y WOODS R.A. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 892-900

- MORTON M.E., PERLMAN I., ANDERSON E. y CHAIKOFF I.L. (1942)  
*Endocrinology* 30, 495
- MÜLLER M.J. y SEITZ H.J. (1984) *Klin. Wochenschr.* 62, 49-55
- NAGAOKA S., MASAKI H., AOYAMA Y. y YOSHIDA A. (1986) *J. Nutr.*  
116, 726-731
- NEJAD N.S. y CHAIKOFF I.L. (1963) *Amer. J. Physiol.* 204, 137-139
- NESS G.C., DUGAN M.R., LAKSHMANAN M.R., NEPOKROEFF C.M. y PORTER  
J.W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3839-3842
- O'HEA E.R. y LEVEILLE G.A. (1969) *Comp. Biochem. Physiol.* 30,  
149-159
- OPPENHEIMER J.M., SCHWATZ H.C. y SURKS M.I. (1972) *J. Clin.*  
*Invest.* 51, 2493
- PACKIE R.M. y KANDUTSCH A.A. (1973) *Biochem. Genet.* 4, 203-214
- PANINI S.R., SEXTON R.C. y RUDNEY H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259,  
7767-7771
- PEREZ-LOPEZ J., SANCHO M.J., MARINO A. y MACARULLA J.M. (1984)  
*Exp. Clin. Endocrinol.* 84, 45-51
- PITT-RIVERS R. y TATA J.R. (1959) En *The Thyroid Hormones* p. 79  
Pergamon Press Oxford
- POPJAK G. (1970) *Ann. Intern. Med.* 72, 106
- POPJAK G. y BEECKMANS M.L. (1950) *Biochem. J.* 47, 233-238
- POPJAK G. y CORNFORTH R.H. (1960) *J. Chromatogr.* 4, 214

- RAHEJA K.L. y LINSCHER W.G. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* 64B, 289-291
- RAHEJA K.L. y SNEDECOR J.G. (1975) *Gen. Pharmacol.* 6, 69-73
- RAICHT R.F., COHEN I.B., SHEEFER S. y MOSBACH E.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 374-384
- RAMACHANDRAN C.K. y SHAH S.N. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 42
- RAMACHANDRAN C.K. y SHAH S.N. (1977) *J. Neurochem.* 28, 751-757
- RAMASARMA T. (1973) *Curr. Top. Cell. Regul.* 6, 164
- RAMIREZ H., ALEJANDRE M.J., ZAFRA M.F., SEGOVIA J.L. y GARCIA-PEREGRIN E. (1984) *Int. J. Biochem.* 16, 291-295
- RAMIREZ H., ALEJANDRE M.J. y GARCIA-PEREGRIN E. (1982) *Lipids* 17, 434-436
- RASKIN P. y SIPERSTEIN M.D. (1974) *J. Lipid Res.* 15, 20-25
- REED W.D., CLINKENBEARD K.D. y LANE M.D. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 3117-3123
- REINECKE E.P. (1946) En *Vitamins and Hormones* Harris y Thilmann ed. cap.4 p.207 Academic Press N.Y.
- RICH C., BIERMAN E.L. y SCHWARTZ I.L. (1959) *J. Clin. Invest.* 38, 275-278
- RIGHETTI M., WILEY M.H., MURRILL P.A. y SIPERSTEIN M.D. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2716-2721

- RITTEMBERG D. y SCHOENHEIMER R. (1937) *J. Biol. Chem.* 121, 235-253
- ROCHE J., LISSITZKY S. y MICHEL C.R. (1952) *Compt. Rend. Acad. Sci.* 234, 1228-1230
- RODWELL V.W., NORDSTROM J.L. y MITSCHELEN J.J. (1976) *Adv. Lipid Res.* 14, 1-74
- ROSENMAN R.H., BYERS S.O. y FRIEDMAN M. (1952b) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 1287-1299
- ROSENMAN R.H., FRIEDMAN M. y BYERS S.O. (1952a) *Circulation* 5, 589-593
- SAMPLE C.E., PENDLETON L.C. y NESS G.C. (1987) *Biochemistry* 26, 727-731
- SAMUELS H.H. y TSAI J.S. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3488-3492
- SCAIFE J.F. y MIGICOVSKY B.B. (1957) *Can. J. Biochem. Physiol.* 35, 15-23
- SCHOENHEIMER R. y RITTEMBERG D. (1930) *J. Biol. Chem.* 114, 381-396
- SCHROEPFER G.J., Jr. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 585-621
- SCHROEPFER G.J., Jr. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 555-585
- SEUBERT W. y FASS E. (1964) *Biochem. Z.* 341, 23
- SHAH S.N. (1973) *Lipids* 8, 284-288

SHAPIRO D.J., IMBLUM R.L. y RODWELL V.W. (1969) *Anal. Biochem.* 31, 383-390

SHAPIRO D.J., NORDSTROM J.L., MITSCHELEN J.J., RODWELL V.W. y SCHINKE R.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 369

SHAPIRO D.J. y RODWELL V.W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 867-872

SHAPIRO D.J. y RODWELL V.W. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3210-3216

SHEFER S., HAUSER S., LAPAR V. y MOSBACH E.H. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 402-412

SHEFER S., HAUSER S., LAPAR V. y MOSBACH E.H. (1973) *J. Lipid Res.* 14, 573-580

SHRAGO E., SOLENON J.A. y GORDON E.S. (1971) *Metabolism* 20, 54-62

SHRAGO E., SPENNETTA T. y GORDON E.S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2761-2766

SIEGEL E. y TOBIAS C.A. (1966) *Nature* 212, 1318-1321

SIPERSTEIN M.D. (1970) *Curr. Top. Cell. Regul.* 2, 65-100

SIPERSTEIN M.D. y FAGAN V.M. (1964) En *Advances in Enzyme Regulation* Werber ed. pp.249-264 Pergamon Press Oxford

SIPERSTEIN M.D. y FAGAN V.M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 602-609

SKLAN D., BUDOWSKI P. y HURWITZ S. (1974) *J. Nutr.* 104, 1086-1090

SLAKEY L.L., CRAIG M.C., BEYTIA E., BRIEDIS A., FELDBRUEGGE D.H., DUGAN R.E., QURESHI A.F., SUBBARAYAN C. y PORTER J.W.

- (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022
- SLAKEY L.L., NESS G.C., QURESHI N. y PORTER J.W. (1973) *J. Lipid Res.* 14, 485-494
- SOKOLOFF L. y KAUFMAN S. (1959) *Science* 129, 569
- SOKOLOFF L. y KAUFMAN S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 795-803
- SOLLMANN T. (1957) *En Manual of Pharmacology* W.B. Saunders Co. 8<sup>a</sup> ed. Philadelphia
- SPADY D.K., TURLEY S.D. y DIETSCHY J.M. (1985) *J. Lipid Res.* 26, 465-472
- STRANDBERG T.E., TILVIS R.S. y MIETTINEN T.A. (1981) *Scand. J. Gastroent.* 16, 801-810
- SUGANO M., IDE T., OKAMATSU H., FUJISAKI Y. y TAKAHARA H. (1980) *J. Nutr.* 110, 360-370
- SURKS M.I., KOERNER D., DILLMAN W. y OPPENHEIMER J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7066-7072
- SZERE P.A., CHAIKOFF I.L., TREITMAN S.S. y BURSTEIN L.S. (1950) *J. Biol. Chem.* 182, 629-634
- TAPLEY D.F. y HATFIELD W.B. (1962) *Vitamins, Hormones* 20, 251-283
- TATA J.R. (1964) *Molecular Processes* 58-131
- TATA J.R. (1966) *Nature* 212, 1312-1314
- TATA J.R., ERMSTER L. y LINDBERG O. (1962) *Nature* 193, 1058-1060

- TATA J.R., ERMSTER L., LINDBERG O., ARRHENIUS E., PEDERSEN S. y HEDMAN R. (1963) *Biochem. J.* 86, 408-428
- TA-YAM Ch. (1983) En *The Enzymes* tomo XVI cap. 14
- TAVORMINA P.A., GIBBS M.H. y HUFF J.W. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4498-4499
- TEEKEL R.A., BREIDENSTEIN C.P. y WATTS A.B. (1975) *Poultry Sci.* 54, 1036-1042
- THOMMES R.C. y HYLKA V. (1977) *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 417-422
- TSUNG-CHING H. y SHIH-CHEN W. (1965) *Sci. Sin.* 14, 874-884
- WATSON J.A., HAVEL C.M., GONZALEZ-PACANOWSKA D., RIPMASTER T. y GURFINKEL M. (1986) *In vitro Abstr.* 12
- WATSON J.A., HAVEL C.M., LOBOS D.V., BAKER F.C. y MORROW C.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14083-14091
- WAYNE E.J. (1960) *Brit. Med. J.* 1, 78-90
- WILEY M.H., HOWTON M.M. y SIPERSTEIN M.D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 548-554
- WILEY M.H., HOWTON M.M. y SIPERSTEIN M.D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 837-842
- WIDNELL C.C. y TATA J.R. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 72, 506-508
- WISS O. (1976a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 350-352
- WISS O. (1976b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 353-357



WOODS J.E. y PODCZASKI E.S. (1974) *Gen. Comp. Endocrinol.* 24,  
413-423