

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA
Estante <u>4</u>
Tabla
Núm. <u>2/5</u>

UNIVERSIDAD DE GRANADA	
FACULTAD DE CIENCIAS	
SALIDA	N.º <u>1663</u>
	Fecha <u>6 NOV. 1986</u>

METABOLISMO DEL COLESTEROL Y SU REGULACION EN CELULAS
AISLADAS DE EPITELIO INTESTINAL

José Iglesias Gómez

Tesis Doctoral

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	<u>613503170</u>
Nº Copia	<u>15459883</u>

Gracias a los señores

un profesor de la

la D.A. N.º 171

Tesis doctoral dirigida por el Prof. D. Eduardo García Peregrín, Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Granada, y por la Profa. Dña. Dolores González Pacanowska, Prof. Colaborador de la misma Universidad. Fué leída el día 26 de Septiembre de 1986, ante el tribunal formado por los profesores: Mayor Zaragoza, Univ. Autónoma de Madrid; Núñez de Castro, Univ. de Málaga; Ríos Guadix, Univ. de Granada; García de la Puerta López, Univ. de Granada y Ramírez Rodrigo, Univ. Granada. Obtuvo la calificación de apto "cum laude".

El trabajo que presentamos ha sido realizado en el Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada, durante los años 1983 a 1986, formando parte de un Proyecto de Investigación (1219-84), subvencionado por la C.A.I.C.Y.T.

desee expresar mi profunda gratitud al Sr. Ricardo Barrio Ferragón, director del presente trabajo, quien en un momento difícil de mi carrera profesional, me brindó su apoyo y oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, y una vez en él, gracias a su preparación científica y enorme dimensión humana, guió acertadamente esta primera etapa de mi formación científica.

Particularmente quiero agradecer al Sr. Barrio Ferragón su apoyo y oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, y una vez en él, gracias a su preparación científica y enorme dimensión humana, guió acertadamente esta primera etapa de mi formación científica.

ciencia
liqui
tamb
que
habe
de t
a la
Dona

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en Les Journées du GERLI, París, - Marzo 1985 y en el XII Congreso de la S.E.B., Valencia, Septiembre 1985

Al redactar el presente capítulo de agradecimientos, se me ofrece la oportunidad de expresar el convencimiento de que la realización de un proyecto de esta naturaleza, aunque sea una sola persona la que figure como responsable, es posible gracias a la labor de un equipo que está dispuesto a ofrecer de sí algo más que su trabajo. Por esta razón, deseo expresar mi profunda gratitud al Prof. Eduardo García Peregrín, director del presente trabajo, quién en un momento difícil de mi carrera profesional, me brindó su apoyo y la oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, y una vez en él, gracias a su gran preparación científica y enorme dimensión humana, guió acertadamente esta primera etapa de mi formación científica.

De igual manera, a la Profra. Dolores González Pacanowska, verdadero motor impulsor de esta Memoria, no solo por su completísimo trabajo de codirección, dejando en todo momento constancia de su elevada capacidad profesional, sentido de la responsabilidad y firmeza ante el desaliento, sino también por su gran categoría humana, de la que me ha dado sobradas pruebas después de haber compartido con ella muchísimas horas de trabajo.

Deseo también expresar mi gratitud a la Profra. M. Dolores Suárez, directora del Departamento, y al Prof. Fermín Sánchez de Medina, que lo era cuando tomé mi primer con-

tacto con la Bioquímica, por haber conseguido que me sintiese de hecho como un miembro más del Departamento, cuando aún no lo era - de derecho.

Al Prof. Carlos Gómez-Moreno por haberme introducido en el Departamento.

A la Dra. Carmen Marco por su generosa y eficaz ayuda, incluso a costa de sacrificar su sueño y sus obligaciones familiares.

A la Dra. Josefa L. Segovia por su contagioso optimismo, y por su excelente disposición para resolver tantas cuestiones como le he planteado.

A los Dres. Marichu Alejandre e Hilario Ramírez por sus oportunas y acertadas observaciones cuando, a pesar de haber cruzado los dedos, no salía la reductasa.

A Guillermo, que al haber puesto sus conocimientos de informática (y música) a mi servicio, ha hecho que el trabajo sea mas fácil (y grato). A Miguel, compañero de viaje durante tantas horas. A Víctor, Juan Antonio, Felipe, Maite, Virginia, y demás -- compañeros del Departamento , tanto por su desinteresada ayuda, como por haberme hecho comprender el valor del trabajo en equipo.

A mis compañeros del Departamento de Biología, por el estímulo y comprensión - que en todo momento he encontrado en ellos, y de forma especial, en Maritina.

A Pedro Casero, no solo por la realización de los cortes histológicos, sino -- también por su inestimable amistad. A Alberto Tinaut, por haber abusado de su ofrecimiento para la confección de las diapositivas. A -- Luis Caballero, por sus excelentes lecciones sobre microfotografía.

Al personal auxiliar del Departamento, especialmente a M. Dolores Franco y - Dolores Maldonado, por su valiosa asistencia técnica. A Elena, porque sufrió las prisas - de última hora en el mecanografiado del original.

A mis hermanas, amigos, y especialmente a todas aquellas personas que por un - fallo involuntario de mi memoria no haya --- mencionado. A todos, gracias.

A mi padre (4-5)

A mi madre

ACAF	Acil-CoA colesterol acil transferasa	
ATP	Adenosin 5-trifosfato	
CoA	Coenzima A	
c.p.m.	Cuentas por minuto	
DEAE	Dietil-amino etil	
D.O.	Densidad óptica	
d.p.m.	Desintegraciones por minuto	
DMS	Esteroles precipitables con digitonina	
DTT	Ditiotreitol	
EDTA	Etilen-diaminetetraacético	
G6P	Glucosa 6 fosfato	
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	
HDL-CoA	Hidroxicetil glutaril-CoA	
LDL	Lipoproteínas de densidad intermedia	
IPAP	Isopentenil pirofosfato	
K _m	Constante de Michaelis-Menten	
LCAT	Lecitín-colesterol acil transferasa	
LDL	Lipoproteínas de baja densidad	
LPL	Lipoproteína lipasa	
MVA	Acido mevalónico	
NADP ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato	
PBS	Solución salina tamponada	
PMVA	Acido fosfomevalónico	
POPOP	2,2-p-terilil bis-10-feniloxano	
PPMVA	Acido pirrolofosfomevalónico	
PPO	2,5-difeniloxazol	A mi padre (q.e.p.d.)
c.p.m.	Revoluciones por minuto	A mi madre
S.E.M.	Error estándar de la media	
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad	

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA colesterol acil transferasa
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
c.p.m.	Cuentas por minuto
DEAE	Diethyl-amino etil
D.O.	Densidad óptica
d.p.m.	Desintegraciones por minuto
DPS	Esteroles precipitables con digitonina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilén-diaminotetraacético
G6P	Glucosa 6 fosfato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG--CoA	Hidroxiacetil glutaril-CoA
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IpPP	Isopentenil pirofosfato
Km	Constante de Michaelis-Menten
LCAT	Lecitín-colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoprotein lipasa
MVA	Acido mevalónico
NADP ⁺	Nicotinamida-adenín dinucleótido fosfato
PBS	Solución salina tamponada
PMVA	Acido fosfomevalónico
POPOP	2,2'-p-fenilén bis-(5-feniloxazol)
PMPVA	Acido pirofosfomevalónico
PPO	2,5-difeniloxazol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S.E.M.	Error estándar de la media
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN.....	15
1.- PARTE TEORICA.....	19
1.A.- Ruta biosintética del colesterol.....	19
1.A.1.- Conversión de acetil-CoA a isopentenil pirofosfato.....	21
1.A.2.- Conversión de isopentenil pirofosfato a colesterol.....	22
1.B.- Dinámica del colesterol.....	26
1.B.1.- Absorción y transporte.....	27
1.B.1.1.- Sistema de transporte exógeno.....	29
1.B.1.2.- Sistema de transporte endógeno.....	30
1.B.2.- Síntesis.....	33
1.B.3.- Transformación y eliminación.....	37
1.C.- Papel del intestino en el metabolismo lipídico.....	40
1.C.1.- Estructura del intestino delgado.	41
1.C.2.- Absorción intestinal de lípidos..	45
1.C.3.- Formación de lipoproteínas en el enterocito. Transformación del material absorbido.....	49
1.C.4.- Síntesis intestinal de lípidos...	51
1.C.4.1.- Biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos.....	51
1.C.4.2.- Biosíntesis intestinal de colesterol y su regulación..	57

	<u>Página</u>
1.C.4.2.1.- Importancia de la HMG-CoA reductasa intestinal.....	65
1.C.4.2.2.- Importancia de la PPMVA descarboxilasa intestinal.....	77
1.C.5.- Esterificación intestinal del colesterol. Importancia de la ACAT.	80
2.- PLAN DE TRABAJO.....	88
3.- MATERIAL Y METODOS.....	89
3.A.- Material.....	89
3.A.1.- Material biológico.....	89
3.A.2.- Dietas y acondicionamiento de los animales.....	89
3.A.3.- Aparatos e instrumentación.....	90
3.A.4.- Reactivos.....	92
3.B.- Métodos.....	93
3.B.1.- Aislamiento de enterocitos.....	93
3.B.2.- Preparaciones enzimáticas.....	97
3.B.3.- Determinación del contenido proteico.....	97
3.B.4.- Determinación de la actividad timidina kinasa.....	98
3.B.4.1.- Reacción enzimática.....	98
3.B.4.2.- Aislamiento y medida del producto de la reacción.....	99
3.B.5.- Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.....	100
3.B.5.1.- Reacción enzimática.....	101
3.B.5.2.- Determinación del producto de la reacción.....	101
3.B.6.- Determinación de la actividad fosfatasa ácida.....	102

	<u>Página</u>
3.B.6.1.- Reacción enzimática.....	103
3.B.6.2.- Determinación del producto de la reacción.....	103
3.B.7.- Determinación de la actividad PPMVA descarboxilasa.....	104
3.B.7.1.- Reacción enzimática.....	105
3.B.7.2.- Detección y medida de los productos de la reacción....	106
3.B.8.- Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa.....	108
3.B.8.1.- Reacción enzimática.....	109
3.B.8.2.- Aislamiento y medida del producto de la reacción.....	110
3.B.9.- Determinación de la actividad ACAT.....	112
3.B.9.1.- Reacción enzimática.....	113
3.B.9.2.- Aislamiento y medida del producto de la reacción.....	114
3.B.10.- Determinación de la actividad acil-CoA hidrolasa.....	117
3.B.11.- Determinación de la incorpora- ción de oleil-CoA a triglicé- ridos.....	118
3.B.12.- Determinación de la incorpora- ción de oleil-CoA a fosfolípidos	119
3.B.13.- Determinación de colesterol to- tal y libre.....	120
3.B.13.1.- Extracción lipídica.....	120
3.B.13.2.- Determinación de colesterol total.....	121
3.B.13.3.- Determinación de colesterol libre.....	123
3.B.14.- Tratamiento de datos.....	124

	<u>Página</u>
4.-RESULTADOS.....	126
4.A.- Establecimiento de los criterios para la clasificación de las poblaciones celulares aisladas de intestino.....	126
4.A.1.- Duodeno.....	126
4.A.1.1.- Actividad fosfatasa alcalina	126
4.A.1.2.- Actividad timidina kinasa...	127
4.A.1.3.- Actividad fosfatasa ácida...	127
4.A.1.4.- Microfotografías de cortes histológicos del duodeno de pollo.....	127
4.A.2.- Yeyuno.....	132
4.A.2.1.- Actividad fosfatasa alcalina	132
4.A.2.2.- Actividad timidina kinasa...	132
4.A.2.3.- Actividad fosfatasa ácida...	133
4.A.2.4.- Microfotografías de cortes histológicos del yeyuno de pollo.....	133
4.A.3.- Íleon.....	138
4.A.3.1.- Actividad fosfatasa alcalina	138
4.A.3.2.- Actividad timidina kinasa...	138
4.A.3.3.- Actividad fosfatasa ácida...	138
4.A.3.4.- Microfotografías de cortes histológicos de íleon de po- llo.....	139
4.B.- Establecimiento de las condiciones óp- timas para el ensayo "in vitro" de la actividad HMG-CoA reductasa en ente- rocitos.....	144
4.B.1.- Influencia del tiempo de incuba- ción.....	144
4.B.2.- Influencia de la concentración proteica.....	144

	<u>Página</u>
4.B.3.- Distribución subcelular de la actividad HMG-CoA reductasa.....	149
4.B.4.- Influencia del inhibidor de la tripsina sobre la actividad HMG-CoA reductasa.....	149
4.C.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el ensayo "in vitro" de la actividad PPMVA descarboxilasa en enterocitos.....	152
4.C.1.- Influencia del tiempo de incubación.....	152
4.C.2.- Influencia de la concentración proteica.....	155
4.C.3.- Distribución subcelular de la actividad PPMVA descarboxilasa.....	155
4.D.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el ensayo "in vitro" de la actividad ACAT en enterocitos.....	159
4.D.1.- Influencia del tiempo de incubación.....	159
4.D.2.- Influencia de la concentración proteica.....	159
4.D.3.- Distribución subcelular de la actividad ACAT.....	165
4.E.- Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa y ACAT en mucosa raspada de duodeno, yeyuno e íleon.....	165
4.F.- Variaciones del metabolismo lipídico a lo largo del eje longitudinal y transversal del intestino.....	165

	<u>Página</u>
4.F.1.- Variaciones del contenido en co- lesterol.....	167
4.F.2.- Variaciones en la actividad HMG- CoA reductasa.....	167
4.F.3.- Variaciones en la actividad PPMVA descarboxilasa.....	174
4.F.4.- Variaciones en la actividad ACAT.	174
4.F.5.- Variaciones en la actividad acil- CoA hidrolasa.....	174
4.F.6.- Variaciones en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.....	183
4.F.7.- Variaciones en la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.....	183
4.G.- Efecto de la suplementación de la die- ta con colesterol o colestiramina, so- bre el metabolismo lipídico en duodeno	194
4.G.1.- Efecto sobre el contenido en co- lesterol.....	195
4.G.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.....	195
4.G.3.- Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.....	195
4.G.4.- Efecto sobre la actividad ACAT...	206
4.G.5.- Efecto sobre la actividad acil- CoA hidrolasa.....	211
4.G.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.....	211
4.G.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.....	211
4.H.- Efecto de la suplementación de la die- ta con colesterol o colestiramina, so- bre el metabolismo lipídico en yeyuno.	222

	<u>Página</u>
4.H.1.- Efecto sobre el contenido en co- lesterol.....	222
4.H.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.....	225
4.H.3.- Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.....	225
4.H.4.- Efecto sobre la actividad ACAT...	230
4.H.5.- Efecto sobre la actividad acil- Coa hidrolasa.....	239
4.H.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.....	239
4.H.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.....	246
4.I.- Efecto de la suplementación de la die- ta con colesterol o colestiramina, so- bre el metabolismo lipídico en íleon..	251
4.I.1.- Efecto sobre el contenido en co- lesterol.....	251
4.I.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.....	254
4.I.3.- Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.....	254
4.I.4.- Efecto sobre la actividad ACAT...	265
4.I.5.- Efecto sobre la actividad acil- CoA hidrolasa.....	265
4.I.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.....	270
4.I.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.....	270
5.- DISCUSION.....	280
6.- CONCLUSIONES.....	314
7.- BIBLIOGRAFIA.....	318

El 9 de Diciembre de 1985, con ocasión de la - recepción del Premio Nobel en Medicina, Michael Brown y Joseph L. Goldstein decían en Estocolmo: "El colesterol es la molécula relativamente pequeña más condecorada en Biología. Trece Premios Nobel se han concedido a científicos que han dedicado la mayor parte de sus atenciones al colesterol. Esta sustancia ha ejercido una fascinación casi hipnotizante sobre científicos de las más diversas áreas de las Ciencias y la Medicina. Su compleja estructura tetracíclica y su síntesis a partir de un sustrato dicarbonado sencillo (el acetato), mediante la intervención de más de 30 enzimas, ha atraído la atención de químicos orgánicos y bioquímicos. Los fisiólogos y los citólogos han sido fascinados con el colesterol por su función esencial en las membranas de las células animales, donde modula la fluidez y mantiene la barrera entre la célula y el ambiente que la rodea, actuando también como material de partida para la síntesis de hormonas y ácidos biliares. Finalmente, la observación de que elevados niveles de colesterol plasmático aceleran la formación de - placas ateromatosas ha sido de gran interés para los médicos." Creemos que no se puede resumir de una manera más acertada la importancia que el colesterol representa para los animales superiores y, entre ellos, para el hombre.

Los dos problemas mas acuciantes aún por resolver de una manera definitiva en relación con el colesterol son, su síntesis y su transporte. Los organismos pruricelulares parecen haber solucionado el problema del - transporte esterificando el colesterol con ácidos grasos de larga cadena y empaquetándolo dentro de un núcleo - hidrofóbico de lipoproteínas plasmáticas. Sin embargo, este sistema de transporte crea otro problema en relación a

su eliminación: los ésteres del colesterol son demasiado hidrofóbicos para pasar a través de las membranas. Esta dificultad se ha solventado mediante la actuación de los receptores de las lipoproteínas, los cuales, estratégicamente situados en la superficie de las células, las captan y las conducen al interior celular mediante un proceso de endocitosis.

En relación a la síntesis, se tiende a aceptar que el hígado y el intestino son responsables de aproximadamente un 90% de la producción del colesterol en los animales. La importancia cuantitativa del intestino en la colesterogénesis fué puesta de manifiesto inicialmente - midiendo la incorporación de diversos precursores marcados en esteroides precipitables con digitonina. Los estudios más recientes utilizando agua tritiada como precursor han demostrado que, en rata, el 24-25% del colesterol corporal es sintetizado en el intestino delgado, mientras que un 50% de la síntesis total ocurre en el hígado. Sin embargo, en otras especies animales como conejo, hamster, ardilla y posiblemente en el hombre, la función del intestino puede ser cuantitativamente más importante. Por otra parte, el intestino delgado juega también un papel clave en el balance del colesterol por ser el sitio en que se produce la absorción del colesterol de la dieta, con todo lo que esto lleva consigo en cuanto a su consiguiente transporte a través del sistema linfático y vascular a los distintos órganos en que se puede depositar.

No obstante lo anteriormente mencionado, es poco lo que se conoce a nivel intracelular acerca del metabolismo del colesterol atendiendo a sus distintos orígenes. Basándose en la relación entre síntesis y esterifi-

cación en la mucosa intestinal de la rata se ha sugerido recientemente que el colesterol absorbido ingresa en el "pool" intracelular del enterocito que está separado funcionalmente del "pool" de colesterol sintetizado "in situ". Este modelo podría explicar la dicotomía funcional que parece existir entre colesterol exógeno y endógeno, si bien aún falta la suficiente evidencia para probarlo.

Como un intento de contribuir a la elucidación de este problema así, como a la controversia aún existente sobre la localización anatómica de la colesterogénesis intestinal, se ha planteado el trabajo experimental de la presente Memoria. Las razones de dicha controversia son fundamentalmente resultado de los problemas técnicos asociados a la medida de la velocidad de síntesis, que normalmente se lleva a cabo mediante la incorporación de diferentes precursores (acetato, octanoato, mevalonato, glucosa o agua) que tienen que penetrar en el interior celular y sufrir la correspondiente dilución intracelular. Para obviar, al menos en parte, estos problemas se ha medido la actividad colesterogénica del intestino en base a los niveles de la enzima limitante del proceso, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. Así mismo, teniendo en cuenta la importancia que parece tener la pirofosfomevalonato descarboxilasa en la regulación del mismo fenómeno biosintético, se han determinado los niveles de su actividad en las mismas condiciones y circunstancias que la reductasa. Como índice de la velocidad de esterificación del colesterol se ha medido la actividad de la enzima acil-CoA: colesterol acil transferasa

Por otra parte, el trabajo se ha llevado a cabo utilizando células superiores de la velloosidad, medias, inferiores y de las criptas, aisladas de duodeno, yeyuno

e ileon de pollos de 30-35 días. Con ello se ha pretendido no solo incidir en el conocimiento de la función relativa que los diferentes tipos celulares tienen en el metabolismo intestinal del colesterol, sino que también, teniendo en cuenta los trabajos previos desarrollados en nuestro Departamento, poner de manifiesto la funcionabilidad de tales mecanismos de regulación a nivel de las diferentes células aisladas y la importancia de la compartimentación de la síntesis y esterificación del colesterol, todo ello dentro del fascinante mundo de esta sustancia y de acuerdo con las palabras con las que comenzábamos la presente Memoria.

1.1.1. - Nivel bioquímico del colesterol

En el nivel bioquímico de la circulación sanguínea se observa un nivel de colesterol de 150-200 mg/dl. En un organismo humano se sintetiza un promedio de 1 g de colesterol al día. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Al comprobar la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa por vía oral, se observa que el colesterol del hígado se sintetiza de forma independiente. Por otra parte, el colesterol que se sintetiza en el hígado se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas.

En el nivel bioquímico de la circulación sanguínea se observa un nivel de colesterol de 150-200 mg/dl. En un organismo humano se sintetiza un promedio de 1 g de colesterol al día. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Al comprobar la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa por vía oral, se observa que el colesterol del hígado se sintetiza de forma independiente. Por otra parte, el colesterol que se sintetiza en el hígado se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas.

PARTE TEORICA

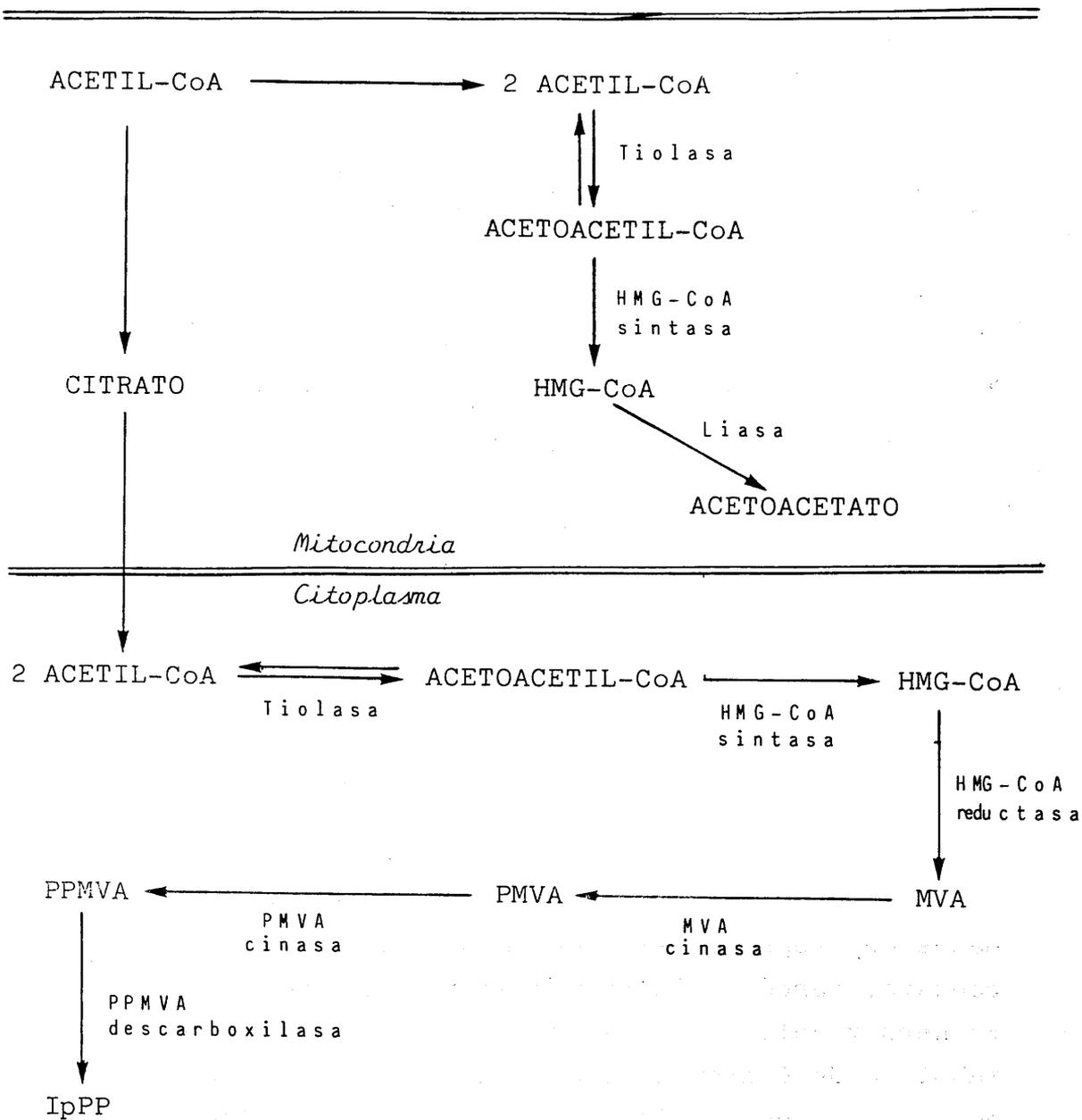
El colesterol es un compuesto orgánico que forma parte de la estructura de las membranas celulares. Se sintetiza en el hígado a partir de acetil-CoA. El colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas. Este colesterol se transporta en la sangre en forma de lipoproteínas.

1.- PARTE TEORICA

1.A.- Ruta biosintética del colesterol

Un acontecimiento clave en la elucidación del proceso de formación del colesterol, fué el descubrimiento de K. Bloch (1,2) de que el escualeno, un hidrocarburo isoprenoide de cadena abierta, es un producto intermedio en la ruta biosintética, al comprobar que -- tras la administración de ^{14}C -acetato por via oral a -- animales de experimentación, el escualeno del hígado -- resultaba marcado radiactivamente. Por otra parte, ad-- ministrando posteriormente escualeno radiactivo a anima-- les de experimentación, o incubándolo con cortes de hí-- gado, una gran parte del isótopo aparecía en la molé--- cula del colesterol.

Sin embargo, el mecanismo por el cual las uni-- dades de isopreno del escualeno se forman a partir del-- acetato, tardó algún tiempo en ser aclarado. En 1956 --- Folkers y col. (3) descubrieron el ácido mevalónico, me-- tabolito de 6 átomos de carbono, originado a partir del-- acetato, al que podía sustituir como factor de crecimi-- miento en determinados cultivos de bacterias. Es más, -- la incubación de acetato marcado isotópicamente con cor-- tes de hígado mostró que este compuesto constituía un -- precursor inmediato del ácido mevalónico. De ello se de-- dujo que dicho ácido de 6 carbonos podía dar lugar a la formación de una unidad isopreno, de 5 átomos de carbono, por descarboxilación (esquema 1).



Esquema 1

1.A.1.- Conversión de acetil-CoA a isopentenil pirofosfato

Todas las enzimas que catalizan la conversión de acetil-CoA a isopentenil pirofosfato en la biosíntesis de esteroides son citosólicas, excepto la HMG-CoA -- reductasa, que se localiza en el retículo endoplasmático de aves y mamíferos, y en las mitocondrias de lavaduras.

El primer eslabón en la biosíntesis del colesterol es el de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa (acetil-CoA acil transferasa), para formar acetoacetil-CoA y -- CoA libre.

La siguiente reacción es la catalizada por la enzima β -hidroxi- β - metilglutaril-CoA sintasa, que consiste en una reacción de condensación de aceto-acetil -- CoA con acetil-CoA, para formar HMG-CoA y CoA libre.

La acetoacetil-CoA tiolasa y la HMG-CoA sintasa exhiben una localización doble, citoplasmática y -- mitocondrial (4,5). Tanto la tiolasa como la sintasa -- -- citoplasmáticas muestran un control de su actividad por dietas con colesterol o colestiramina; en cambio las de localización mitocondrial no se afectan por estas dietas, pero sí por los niveles de cuerpos cetónicos circulantes. Estos hechos llevaron a pensar que el HMG-CoA sintetizado en el citoplasma se destinaría a la formación de compuestos isoprenoides y el mitocondrial a la de cuerpos -- cetónicos.

Actualmente se sabe que existe una conexión -- entre las rutas cetogénica y colesterogénica, postulándose que el punto de conexión sería el isopentenil -- PP y que parte de este compuesto formado en el citoplasma puede, tras una serie de transformaciones enzimáticas,

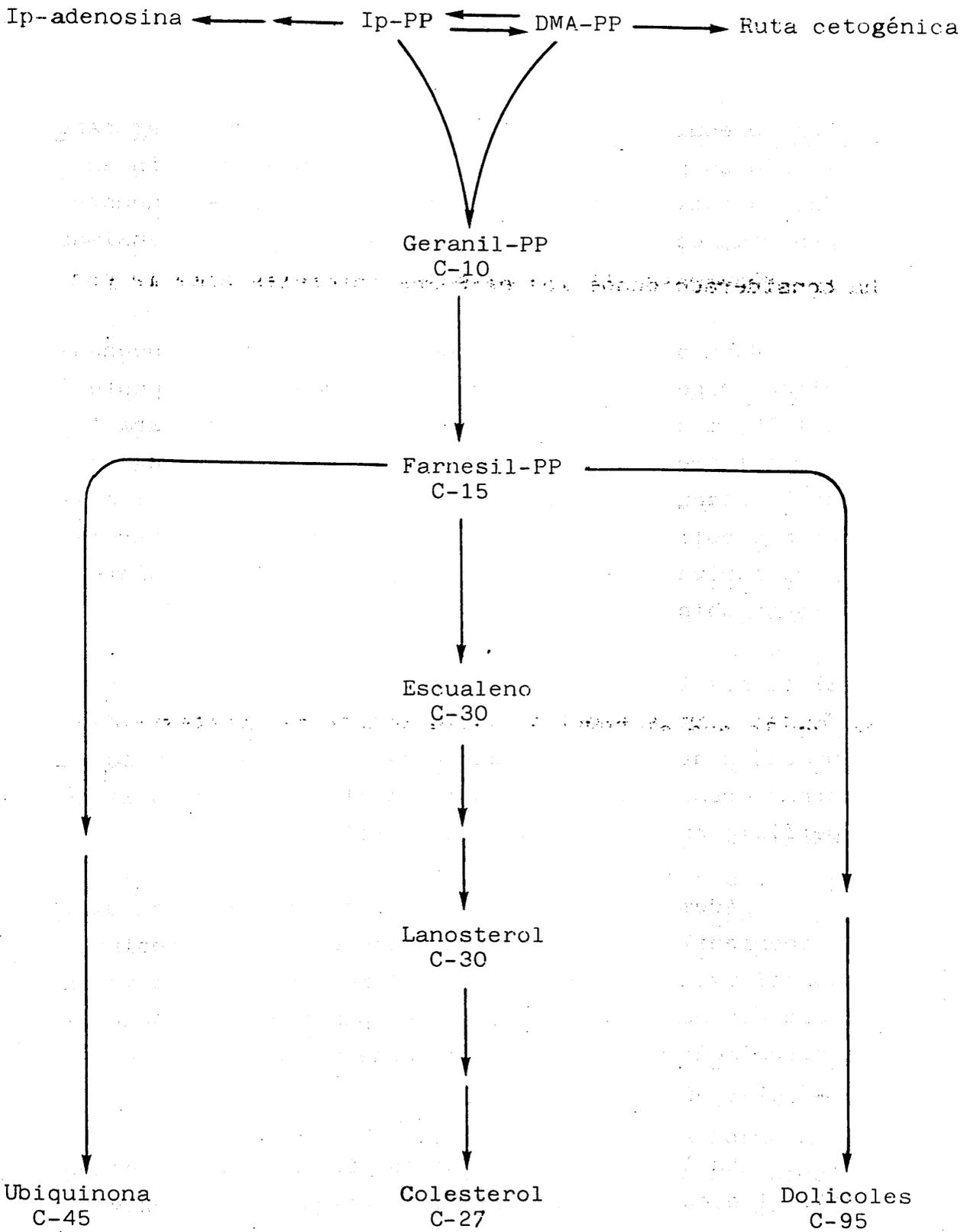
penetrar en la mitocondria, donde sería convertido de nuevo en HMG-CoA y posteriormente en cuerpos cetónicos, por acción de la HMG-CoA liasa (ruta cetogénica del mevalonato (5-7)).

El HMG-CoA generado en el citoplasma sufre una reducción, catalizada por la HMG-CoA reductasa microsomal, originándose ácido mevalónico (MVA). Esta enzima se ha considerado desde los estudios iniciales como la enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol (8).

La conversión del MVA a isopenteñil pirofosfato se produce mediante tres reacciones. Las dos primeras, son dos fosforilaciones que suponen la conversión de MVA a ácido fosfomevalónico, y de éste a ácido pirofosfomevalónico, estando catalizadas, respectivamente, por las enzimas MVA cinasa y PMVA cinasa. La tercera reacción, catalizada por la enzima PPMVA descarboxilasa, consiste en una deshidratación y una descarboxilación ATP dependiente, en la que el PPMVA es convertido a isopentenil pirofosfato. Evidencias recientes sugieren que este último paso puede ser también un punto clave en la ruta coles-terogénica.

1.A.2.- Conversión de isopentenil pirofosfato a colesterol

La reacción inicial consiste en una condensación cabeza-cola entre el isopentenil pirofosfato y su isómero, el dimetil alil pirofosfato, para formar el intermediario de 10 átomos de carbono geranil pirofosfato, por acción de la dimetil alil transferasa. El geranil pirofosfato reacciona con otra molécula de isopentenil pirofosfato en otra condensación cabeza-cola, para formar farnesil pirofosfato, por acción de la farnesil pirofosfato sintetasa.



Esquema 2

De acuerdo con la evidencia actual, el farnesil pirofosfato constituye el principal punto de ramificación para la biosíntesis de poliisoprenoides (9,10):

- a) Dos moléculas de farnesil-PP se pueden condensar cabeza-cabeza para formar escualeno, en una reacción enzimática catalizada por la escualeno sintetasa, nombre genérico con el que se conocen al menos a dos enzimas microsómicas, responsables de realizarla. (11).
- b) La cadena de farnesil PP puede aumentar por condensaciones repetidas cabeza-cola con grupos de isopentenil-PP, mediante una trasnprenil transferasa para formar poliprenoles de larga cadena. Cuando la longitud de la cadena alcanza 10 unidades isoprenoides, los grupos poliprenoles se transfieren a un anillo aromático derivado de la tirosina, para iniciar la síntesis de ubiquinona (12).
- c) El farnesil PP, por otra parte, se puede convertir en dolicol, un alcohol poliisoprenoide que contiene 19 unidades de isopreno y que está relacionado con la transferencia de azúcares desde el citoplasma a la superficie exterior de la célula (10).

Además de las rutas anteriormente mencionadas, el isopentenil-PP puede originar isopentenil adenosina, un constituyente del RNA de transferencia (13), y como anteriormente hemos señalado, ser el punto de desviación que actualmente se postula para conectar colesterogénesis y cetogénesis.

En la última etapa de la biosíntesis del colesterol, el escualeno experimenta un ataque por el oxígeno molecular, formando el escualeno-2-3 epóxido, reacción catalizada por la escualeno monooxigenasa. El escualeno-2-3- epóxido experimenta una ciclación a lanosterol, que

es el primer esteroide que se produce, por la acción de la enzima 2-3- epóxido de escualeno: lanosterol ciclasa.

Estas reacciones tienen lugar en los microsomas, pero requieren la participación de dos proteínas -- del citosol.

La conversión de lanosterol en colesterol implica la eliminación de tres grupos metilo (dos del átomo del carbono 4 y uno del carbono 14), la saturación -- del doble enlace de la cadena lateral, y el desplazamiento del doble enlace desde la posición 8-9 a la 5-6 del -- anillo B (esquema 2).

De acuerdo con el esquema 2, cabe pensar que la producción de isopentenil-PP debe estar cuidadosamente controlada con el objeto de poder satisfacer las necesidades celulares de todos sus derivados. Además, el mecanismo de control debe ser suficientemente eficaz como para permitir la constante síntesis de los tres productos finales no esteroídicos, en los casos en los que las necesidades celulares de colesterol están satisfechas.

Este control parece conseguirse a través de una regulación "feed-back" multivalente sobre la HMG-CoA reductasa, mediada por colesterol ligado a LDL, junto con uno o más productos del metabolismo del mevalonato (14-16).

Mediante estudios de incorporación de precursores marcados, Wiss y col. han demostrado la existencia de un lugar de regulación posterior a la formación de escualeno (195). Slakey y col. a partir de los cambios observados en la incorporación de MVA a colesterol, y del comportamiento de las enzimas intermediarias, indican -- que existen al menos dos lugares secundarios de regulación (196).

1.B.- Dinámica del colesterol

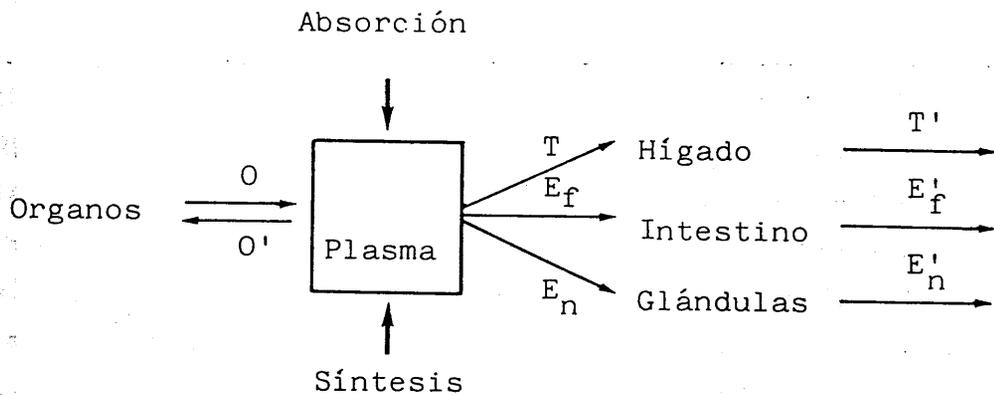
Puesto que los animales carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo esteroide de la molécula de colesterol, y que un acúmulo de este compuesto, por encima de determinados niveles, sería desaconsejable, es evidente que la tasa de colesterol que consume el organismo debe estar equilibrada con la que es capaz de excretar. El colesterol entra a formar parte del "pool" - corporal sólo por dos fuentes. Puede ser absorbido de la dieta (300-500 mg/día en el hombre) o puede ser sintetizado por distintos órganos (700-900 mg/día en el hombre). La excreción del colesterol puede realizarse como tal - colesterol, vía excreción al tracto gastrointestinal --- (600 mg/día) o por descamación de la piel (85 mg/día), - sufrir previamente una transformación a ácidos biliares y posteriormente excretarse como tales (400 mg/día), o -- bien convertirse en hormonas esteroideas y ser excretado a la bilis u orina (50 mg/día) (19).

Durante la fase de desarrollo la tasa de adquisición de colesterol por parte del organismo supera a la de excreción, hasta que en un estado estacionario en el que no hay ni pérdida ni ganancia de peso, el contenido corporal de colesterol se estabiliza, en el hombre, en un promedio de aproximadamente 1.5 g de colesterol por Kg.- de peso corporal.

Un modelo dinámico del colesterol sería el propugnado por Mathé y Chevalier (20) y que aparece representado en el esquema 3. La elaboración del mismo está basada en datos obtenidos por el método del equilibrio isotópico (21), consistente en la recuperación total y determinación de los esteroides fecales, así como la medida de la síntesis, excreción y absorción en situación de estado estacionario, es decir, en individuos en los que la entradas totales de colesterol al cuerpo se igualen a las salidas.

De acuerdo con dicho esquema, el colesterol es transferido desde el compartimento plasmático central hacia el hígado (salida T), donde se transforma en ácidos biliares (salida T'). Una segunda ruta para la eliminación del colesterol desde el compartimento plasmático requiere la mediación del tracto digestivo y concluye en la eliminación urinaria de esteroides derivados del colesterol (salidas E_f y E_n respectivamente). Cada una de estas rutas de eliminación del colesterol plasmático constituye a su vez un subsistema catenario mas o menos complejo. Por otra parte, hay movimientos bidireccionales entre todos los órganos y el plasma, cualquiera que sea el proceso implicado (O y O').

Pasemos a continuación a desarrollar brevemente los principales procesos relacionados con la dinámica del colesterol.



Esquema 3

1.B.1.- Absorción y transporte

La diferencia entre el colesterol ingerido y el eliminado en las heces se considera como un índice de la

absorción neta de colesterol. La mayoría del colesterol ingerido se encuentra en la forma libre, aunque un poco esterificado que penetra en el lumen intestinal es rápidamente hidrolizado por acción de la colesterolesterasa pancreática (22,23). El hombre puede absorber el colesterol de la dieta, que antes de penetrar en el lumen intestinal se mezcla con el endógeno excretado en la saliva y fluidos gástricos (22).

Así, el colesterol presente en el tracto intestinal es una mezcla del que proviene de la ingesta más el colesterol de síntesis endógena. Debido a que existe una mezcla parcial de estas dos fuentes, se supone la existencia de un coeficiente de absorción distinto para cada una de ellas (24). La mayor parte de los lípidos son absorbidos en el yeyuno, excepto en el caso de las sales biliares que tiene lugar en el íleon distal. (27).

El colesterol, de la misma manera que los otros lípidos de la dieta, es absorbido de la fase micelar cuando ésta entra en contacto con la mucosa intestinal. El transporte hasta el interior de la célula ocurre mediante un proceso independiente del consumo de energía (25), observándose un significativo incremento en la concentración de colesterol en el interior de la célula durante un periodo mucho más largo que el de cualquiera de los otros lípidos absorbidos (26), lo que sugiere que el colesterol absorbido se equilibra rápidamente con las distintas fracciones subcelulares del enterocito.

Una vez en el interior de la célula intestinal, hay un intercambio de colesterol entre quilomicrones y estructuras subcelulares. Parte del colesterol de los quilomicrones es esterificado antes de que las partículas sean secretadas a través de la membrana basal (28). Posteriormente, en el espacio extracelular, los quilomicrones absorben el colesterol libre y probablemente también el esterificado. Se sabe que hay un intercambio de colesterol entre las células intestinales y el lumen, así como

entre células intestinales y espacios extracelulares. También existe una transferencia desde el plasma al líquido extracelular y a su vez es probable que se produzca en el sentido contrario (29).

Los ésteres del colesterol formados en la mucosa intestinal deben ser transportados a todas las células donde el colesterol, ya en su forma libre, es utilizado como componente estructural. Estos esteroides también son fuente de síntesis para hormonas esteroides y ácidos biliares.

Para su transporte en el plasma, los triglicéridos y ésteres del colesterol son empaquetados en partículas lipoproteicas constituidas por un núcleo hidrofóbico rodeado de una monocapa de fosfolípidos polares. La capa superficial también contiene colesterol libre en cantidades pequeñas, junto con proteínas específicas denominadas apoproteínas (30).

La vía de transporte lipoproteico puede dividirse conceptualmente en exógeno y endógeno, dependiendo de que se transporten lípidos de origen dietético o hepático, respectivamente. Ambos sistemas comienzan con la secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos que, en el caso del sistema exógeno están constituidas por los quilomicrones intestinales ya mencionados, mientras que para el sistema endógeno son las lipoproteínas hepáticas de muy baja densidad (VLDL).

1.B.1.1.- Sistema de transporte exógeno

Los quilomicrones con los lípidos incorporados son secretados a la linfa y de allí al torrente sanguíneo. Sin embargo, son demasiado voluminosos para atravesar la barrera endotelial y deben ser metabolizados previamente. Para ello se ligan a una enzima, la lipoproteína lipasa, que está dispuesta en la superficie luminal de las células endoteliales que cubren los capilares del tejido adiposo

y muscular.

A medida que se vá degradando el núcleo de triglicéridos por acción de este enzima, el quilomicrón disminuye de tamaño. El material de superficie sobrante, principalmente fosfolípidos y colesterol libre, es transferido a otra lipoproteína plasmática (HDL) (31). El quilomicrón resultante es liberado de la pared capilar y entra de nuevo en circulación. Esta partícula, conocida como "resto" o "remanente", retiene todavía los ésteres de colesterol y es transportada al hígado donde se une a receptores de superficie específicos que se encuentran exclusivamente en las células del hígado, en las que penetra mediante endocitosis, siendo posteriormente degradada en el interior de lisosomas.

1.B.1.2.- Sistema de transporte endógeno

El hígado empaqueta los triglicéridos resultantes del metabolismo hepático en lipoproteínas que contienen a su vez colesterol y fosfolípidos. Cuando el colesterol de la dieta está disponible, el hígado lo utiliza como fuente de síntesis lipoproteica. Sin embargo, cuando la aportación de la dieta es insuficiente, el hígado aumenta la síntesis de su propio colesterol (32,33).

Para el transporte de triglicéridos y colesterol, el hígado los incorpora a VLDL. El núcleo de esta partícula contiene en su mayor parte triglicéridos sintetizados en el hígado, junto con una menor cantidad de ésteres de colesterol; sobre su superficie despliega predominantemente tres apoproteínas, apoproteína B-100 y E, ambas con capacidad de unirse a los receptores de LDL y una apoproteína C, necesaria para que actúe la lipoproteína lipasa. Cuando una partícula VLDL llega a los capilares del tejido adiposo o del músculo, se extrae de ella los triglicéridos que transporta, por la acción de la enzima lipoproteína lipasa. Con ello se transforma en un nuevo tipo de partícula, de menor tamaño y enriquecida en

ésteres de colesterol, y que retiene aún las dos apoproteínas. Tal partícula recibe el nombre de lipoproteína de densidad intermedia o IDL. El material de superficie sobrante (fosfolípidos y colesterol predominantemente) es transferido a las lipoproteínas HDL, que interaccionan con la enzima lecitin-colesterol aciltransferasa (LACT) que cataliza la esterificación de este exceso de colesterol. Los ésteres sintetizados son transferidos de nuevo a las IDL, seguramente a través de la acción de una proteína de intercambio plasmática (34). El resultado es la reposición de la mayor parte del núcleo de triglicéridos de las VLDL con ésteres del colesterol.

En el hombre, alrededor de la mitad de las partículas IDL desaparecen de la circulación con gran rapidez, (de dos a seis horas después de su formación), ya que se unen muy fuertemente a las células hepáticas, que extraen su colesterol para elaborar nuevas VLDL y ácidos biliares. Las partículas de IDL no capturadas por el hígado permanecen en circulación mucho más tiempo. Dado un tiempo suficiente, la apoproteína E se disocia de ellas, transformándose la partícula en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y que posee un único componente proteico, la apoproteína B-100. Puesto que la afinidad de la apoproteína B-100 por los receptores hepáticos es menor, dichas partículas se mantienen en el torrente sanguíneo más tiempo que las partículas IDL, siendo las responsables del abastecimiento de colesterol a los tejidos periféricos que lo necesitan. En individuos normales, el colesterol ligado a LDL supone aproximadamente los dos tercios del total del colesterol plasmático (35). Niveles altos de esta lipoproteína se asocian con elevados riesgos aterogénicos; en cambio, dado que las HDL son las encargadas de retirar colesterol desde los tejidos hasta el hígado, elevadas concentraciones de esta lipoproteína están asociadas con una reducción de la aterosclerosis sintomática.

Las lipoproteínas circulantes penetran en las

células de los distintos tejidos mediante dos sistemas: - uno supone la existencia de unos receptores específicos - en la membrana plasmática de las células que están encargadas de reconocer las lipoproteínas mediante las apoproteínas específicas de su cubierta, y el otro sistema que - supone la internalización de las lipoproteínas de forma inespecífica por un proceso de endocitosis, dependiendo exclusivamente de su concentración en el medio.

Las células ajustan el número de sus receptores de modo que se incorpore el colesterol suficiente para cubrir sus necesidades sin que se produzca exceso. Por ejemplo, los fibroblastos humanos en fase activa de división, y que por consiguiente requieren un aporte de material para la formación de nuevas membranas, mantienen una dotación máxima de receptores de LDL (unos 40.000 por célula). En las células que han superado la fase de multiplicación, el colesterol que les sigue llegando del exterior, comienza a acumularse, y el sistema de retroinhibición reduce a un décimo la producción de receptores (36).

Aunque todos los tejidos poseen receptores de lipoproteínas en sus membranas, no todos los tienen con igual abundancia. Se ha demostrado, al menos en rata, conejos y monos, que el hígado es el responsable de la retirada del 75% de LDL mediado por receptores, siguiéndole en importancia glándula suprarrenal y ovario (37).

Los receptores de LDL son proteínas que requieren un ión metálico divalente para ligar a las LDL, a las que reconocen a través de la apoproteína B-100 presente en su cubierta (38).

Los receptores se acumulan en regiones especializadas, donde la membrana presenta unas depresiones en forma de cráteres, los denominados hoyos revestidos ("coated pits"). La superficie interna de estos hoyos está recubierta por una proteína denominada clatrina. Cuando la

LDL se liga a su receptor, se observa que pocos minutos después, el hoyo en el que se localiza se invagina y se desprende de la membrana plasmática, formando vesículas revestidas (39).

1.B.2.- Síntesis

Al abordar el tema de la síntesis de colesterol surgen dos cuestiones: en primer lugar, si todos los tejidos tienen la capacidad de sintetizarlo, y en segundo lugar cuál es su tasa de síntesis y de qué manera la regulan.

Las características generales de las velocidades de síntesis y su regulación en los distintos tejidos se conocen desde hace tiempo. Szere y cols. (40) mostraron en 1950 en experiencias llevadas a cabo "in vitro", que el ^{14}C -acetato era activamente incorporado a esteroides - en tejidos tan distintos como intestino, testículo, riñón, piel, cerebro y por supuesto hígado. Informando que los porcentajes de radiactividad recuperados en la fracción de esteroides precipitables con digitonina eran casi tan grande en piel y tracto gastrointestinal como en los cortes hepáticos.

Simultáneamente Popjack y Beeckmans (41) demostraban la colesterogénesis extrahepática en animales intactos. Estos estudios se han confirmado reiteradamente - en diversos laboratorios, siendo hoy notorio que prácticamente la totalidad de los tejidos de mamíferos y aves son capaces, en cierto grado al menos, de sintetizar colesterol "de novo" (42-45).

No obstante, y desde los primeros estudios comparativos, se hizo evidente que esta capacidad estaba desigualmente repartida. De los estudios sistemáticos llevados a cabo "in vitro", en rata, mono y pollo (44, 46, 47), resultó que las mayores velocidades de síntesis de esteroides por unidad de peso de tejido corresponden a dos -

órganos: hígado e intestino delgado, y los más bajos a - músculo y a sistema nervioso central de animales adultos, puesto que en embriones y neonatos la actividad de incorporación de acetato a esteroides es mucho mayor en tejido nervioso, excediendo incluso a los valores encontrados para hígado (48).

La mayor parte de las conclusiones, tanto cualitativas como cuantitativas, acerca de la importancia de - órganos específicos de la síntesis global de esteroides, - están basadas en las medidas "in vitro" de la velocidad de incorporación de distintos sustratos marcados a colesterol. Un precursor comúnmente utilizado ha sido el 1-¹⁴C-acetato, habiéndose evaluado la velocidad de incorporación del mismo a esteroides precipitables con digitonina (DPS). Sin embargo, se ha informado sobre una toma deficiente - de este precursor por parte de los tejidos, así como la existencia de una dilución desigual de la actividad específica del "pool" intracelular de acetil CoA en muchos tejidos, dando lugar a velocidades de síntesis falsas - (49). Estudios recientes llevados a cabo "in vivo" han - indicado que la incorporación de agua pesada a DPS, sería un índice más fiable de las velocidades absolutas de síntesis de colesterol, dado que penetra rápidamente en la célula, manteniendo una actividad específica constante (49-51). Así, utilizando este último precursor, Turley y cols (52) han indicado que la carcasa contribuye aproximadamente en un 26% de la síntesis "in vivo" de los - lípidos precipitables con digitonina, mientras que el hígado y el intestino aportan un 50 y un 24% respectivamente.

Las experiencias llevadas a cabo "in vitro" utilizando diversos precursores marcados, indican así mismo que el hígado presenta la máxima velocidad de síntesis - de esteroides entre los órganos estudiados, seguido del - intestino, (53,54).

En suma, mientras que la información existente

es compatible con la idea de que la síntesis endógena - tiene lugar sobre todo en el hígado e intestino, la implicación exacta de ambos órganos en el proceso de síntesis en el animal intacto, no está del todo clara.

Los mecanismos principales de regulación de la síntesis incluyen, entre otros, procesos tales, como la inhibición por retroalimentación, existencia de ritmos circadianos, fluctuaciones resultantes del ayuno y realimentación, y la circulación enterohepática de ácidos biliares.

Taylor y Gould (55,56), ya informaron a principios de los años cincuenta acerca de una marcada supresión de la colesterogénesis en cortes hepáticos de animales sometidos a una dieta con elevado contenido en colesterol. Posteriormente, estos resultados han sido corroborados por numerosos laboratorios (57,58). Esta supresión aparece como un tipo de inhibición por producto final, - siendo el principal punto implicado un paso anterior a la formación de ácido mevalónico (58,59). Ningún otro tejido además del hígado muestra una supresión tan marcada en su actividad biosintética, aunque el tracto intestinal también exhibe este mecanismo de regulación.

Existen varias pruebas así mismo a favor de la regulación de la biosíntesis por ácidos biliares. En primer lugar, el incremento en tamaño del "pool" de estos compuestos que tiene lugar tras la ingestión de taurocolato sódico, engendra un aumento en la velocidad de recambio del colesterol. Por otro lado, la interrupción de la circulación enterohepática de ácidos biliares mediante una desviación del íleon o la administración de una dieta con colestiramina, origina un incremento en la síntesis hepática (60,61).

Se han observado contradicciones entre los resultados obtenidos "in vitro" y los obtenidos en experien

cias realizadas en el animal intacto. Así, Chevalier (62) indica que la ingesta de colesterol no altera la secreción interna, postulando que quizás los mecanismos reguladores que operan "in vitro" no coinciden con los reales o, por otra parte, que los mecanismos que actúan en el hígado - no son responsables del balance total de colesterol en el cuerpo. Sin embargo, estudios con agua pesada no apoyan este punto de vista. Jeske y Dietschy (51) indican, utilizando esta técnica, que "in vivo" existe una variación diurna en la biosíntesis hepática y que la colesteroogénesis se inhibe fuertemente por alimentación con colesterol, administración de quilomicrones y en condiciones de ayuno.

Un mecanismo de regulación muy importante, identificado mediante la utilización de técnicas tanto "in vitro" como "in vivo", es el mediado por la toma celular de colesterol transportado en lipoproteínas (63,64). A través de este mecanismo, el colesterol es transportado desde el hígado a determinados órganos periféricos, donde es tomado a través de un mecanismo que implica la actuación de un receptor específico de LDL (65). Por otra parte, el colesterol es transportado mediante las lipoproteínas de alta densidad al interior de las células de la glándula adrenal, ovario, y testículos (66). El colesterol que deriva de estas fuentes lipoprotéicas no solo abastece las necesidades metabólicas sino que también su prime parcialmente las velocidades de síntesis "de novo" en los órganos blanco. De esta forma, cuando los niveles de colesterol lipoprotéico descienden en determinadas condiciones, se produce como respuesta un incremento en la síntesis de esteroides (67,68).

Finalmente, el efecto inhibitorio de la colesteroogénesis que posee el ayuno, fué puesto de manifiesto por primera vez por Tonkins y col. (69) y confirmado reiteradamente en otros laboratorios (70). Como en el caso de la alimentación con dieta de colesterol, aquí también se tienen -

pruebas de que la acción se produce a nivel de la HMG-CoA reductasa (71).

1.B.3.- Transformación y eliminación

Bajo condiciones de estado estacionario, las salidas mayoritarias del espacio de transferencia suponen la eliminación fecal de colesterol y su transformación a ácidos biliares, mientras que solo mínimas cantidades son excretadas a través de la piel o eliminadas en forma de hormonas esteroides en la orina (72,73).

Los ácidos biliares se forman en el hígado a partir del colesterol. El primer paso, que constituye una etapa limitante del proceso, supone la 7- α -hidroxilación del colesterol por acción de la colesterol 7- α -hidroxilasa, y está sujeto a una inhibición "feed-back" por los ácidos biliares que retornan al hígado a través de la vena porta. Este reciclaje es necesario para poder satisfacer las necesidades fisiológicas durante el proceso de absorción de las grasas, ya que la cantidad de ácidos biliares sintetizados "de novo" es insuficiente.

Los ácidos biliares son secretados en la bilis en su forma conjugada con glicina o taurina, almacenados en la vesícula y posteriormente liberados al duodeno. Tras participar en la absorción de grasas, son reabsorbidos preferentemente en el íleon por transporte activo (74) y en la porción proximal del tracto gastrointestinal, por transporte pasivo (74,75). Tras la absorción a través de

la mucosa intestinal, pasan a ser transportados a través del sistema porta o de los conductos linfáticos intestinales hasta el hígado, donde vuelven a ser excretados a la bilis. En consecuencia, el "pool" de ácidos biliares - sufre una continua circulación enterohepática, siendo la mayor parte reabsorbido, mientras que una pequeña cantidad es eliminada diariamente en las heces de un hombre sano (76).

Tanto en animales como en el hombre, la producción de ácidos biliares está sujeta a un control fisiológico, habiéndose propuesto al menos dos mecanismos de retroalimentación que regulan este sistema: el primero depende de la cantidad de ácidos biliares que llegan al hígado a través de la circulación enterohepática, mientras que el segundo depende del nivel hepático de colesterol.

En lo que respecta al primer mecanismo, diversos estudios han mostrado un control de la producción - por retroalimentación. Así, tras la canulación del conducto biliar, interrumpiendo por tanto la circulación - enterohepática (77), o la administración de colestiramina, una resina de intercambio iónico capaz de unirse a los ácidos biliares (78), se ha observado un marcado aumento en su excreción. Aunque estos estudios indican de forma inequívoca que la interrupción de la absorción acelera la producción, el mecanismo exacto por el que se articula este sistema no está del todo claro.

Respecto al segundo mecanismo, Mathé y Cheva-

lier (79) exponen que el proceso determinante de la dinámica del sistema de colesterol plasmático sería el transporte particulado de lipoproteínas hacia el hígado, tracto digestivo y glándulas. Este proceso gobernaría a su vez las diversas rutas de eliminación del colesterol plasmático dando lugar a ácidos biliares, excreción fecal de colesterol y de esteroides urinarios.

Gran parte de los aspectos cuantitativos y cualitativos de la secreción biliar de colesterol son semejantes en el hombre, la rata y otros animales. Sin embargo, existen diferencias esenciales que deben ser consideradas. Por ejemplo, tras la administración de una dieta con bajo contenido en colesterol, el nivel de saturación de colesterol en la bilis varía entre las distintas especies. La rata y el perro presentan una concentración biliar menor que diversos primates, incluido el hombre (83, 84). Cuando se aumenta la dosis de colesterol en la dieta, el hombre y/o otras especies incrementan su excreción biliar mientras que en rata puede incluso disminuir (86, 87).

La excreción fecal está influenciada por diversos factores, habiéndose demostrado que la excreción fecal total se encuentra inversamente relacionada con el coeficiente de absorción del colesterol. Sin embargo, al evaluar la relación entre la absorción y el flujo de colesterol secretado desde el intestino al lumen intestinal, se obtienen valores bastante constantes, lo que indica, en rata, una independencia de este parámetro con respecto a las condiciones nutricionales (88).

En ratas alimentadas con una dieta libre de esteroles, el contenido intestinal de estos compuestos, que incluye el colesterol y algunos de sus precursores bio--sintéticos, sufre una modificación bacteriana en el cie--go y colon. Así, parte del colesterol es transformado a coprostanol por reducción del doble enlace del carbono 5 (88,89). La formación del coprostanol también se encue--tra fuertemente influenciada por factores dietarios, ha--biéndose observado un marcado incremento en su formación, tras una alimentación con colesterol, así como una inhibición tras la administración de una dieta suplementada - con ácidos biliares (90).

1.C.- Papel del intestino en el metabolismo lipídico

El intestino delgado desempeña un papel clave en la homeostasis del colesterol, tanto en animales como en el hombre (80).

Es el único lugar en el que se lleva a cabo la absorción del colesterol exógeno procedente de la dieta y además es uno de los tres órganos cuya aportación a la - síntesis "de novo" es mas elevada. En rata por ejemplo, la mucosa intestinal contribuye con un 24% a la síntesis - global de colesterol en el cuerpo, comparado con el 50% con que contribuye el hígado (81). En otras especies, tales como el conejo, el hamster y posiblemente el hombre, el intestino puede ser, cuantitativamente, el órgano más activo en la biosíntesis de colesterol (90-96)

1.C.1.- Estructura del intestino delgado

La estructura del intestino delgado responde a un patrón común en la mayoría de las aves y mamíferos, y refleja la respuesta a dos necesidades: el intestino debe presentar una superficie muy extensa para la absorción, y ha de caber en el pequeño volumen de la cavidad abdominal. Para cumplir tales requisitos, forma asas y presenta varios tipos de proyecciones dirigidas hacia la luz intestinal que incrementan notablemente su superficie.

A lo largo del intestino delgado pueden distinguirse tres regiones: duodeno, yeyuno e íleon, que se corresponden con las porciones proximal, media y distal, respectivamente de dicho órgano. En los tres segmentos, la pared presenta la misma organización estratificada: tres capas exteriores, la serosa, la muscular y la submucosa, rodean una capa interior denominada mucosa, que es la más importante desde el punto de vista de la digestión y absorción de alimentos.

En los mamíferos, incluido el hombre, existen tres tipos de proyecciones dirigidas desde la mucosa hacia la luz intestinal. En orden de tamaño decreciente, y de mayor importancia fisiológica, se suceden los pliegues circulares, las vellosidades (villi) y las microvellosidades (microvilli). Los pliegues circulares son crestas de 8 a 10 milímetros de altura, que abarcan de la mitad a dos tercios de la circunferencia interna del intestino. Los pliegues comienzan cerca del extremo superior del duodeno y terminan hacia la mitad del íleon, estando más desarrollados en la última porción del duodeno y en

el segmento inicial del yeyuno. Los pliegues aumentan - la superficie intestinal hasta tres veces.

El intestino de los micromamíferos y de las aves carece de los citados pliegues y posee únicamente vellosidades y microvellosidades. Las vellosidades o "villi" se proyectan a la luz intestinal desde los pliegues o desde la superficie mucosa que los rodea. Su densidad está comprendida entre 10 y 40 por milímetro cuadrado. Las vellosidades intestinales tienen una altura comprendida entre 0.5 y 1.5 mm, aumentando de esta manera 10 veces más la superficie expuesta al contenido intestinal. Entre las vellosidades existen depresiones, denominadas criptas, - que penetran hasta la muscular. En el interior de cada vellosidad se encuentra una red de vasos sanguíneos y linfáticos en los mamíferos, y solo la red sanguínea en el caso de las aves, que aparecen sostenidas por una trama de tejido fibroso, siendo a estos sistemas que ocupan la parte central de la vellosidad hacia donde se transportan las sustancias nutritivas después de la digestión.

La vellosidad intestinal está cubierta por un epitelio uniestratificado (enterocitos). El epitelio a su vez está formado por dos tipos principales de células: las células caliciformes, que segregan el moco que recubre y protege la pared intestinal, y las células que realizan la absorción, implicadas en funciones de digestión y transporte. Entre las células epiteliales que protegen las criptas y las que recubren la vellosidad intestinal, no hay solución de continuidad. No obstante, las primeras difieren de estas últimas en que son más cortas, aproximada

mente cúbicas, y en que algunos detalles de su superficie están menos desarrollados. Además, en las células de las criptas, pero nunca en las de la vellosidad, pueden observarse figuras mitóticas características de la división celular.

En observaciones llevadas a cabo a microscopía óptica, parece ser que las células de las vellosidades tendrían como función principal la de la absorción, y las de las criptas tendrían como función principal la secretora, si bien la diferenciación funcional no sería tan clara, pues actualmente también se implica a las células de las criptas en los procesos de absorción intestinal y a las de las vellosidades en procesos de secreción.

En 1958 Ch.P. Leblond y B. Messier demostraron que las células de las criptas migraban hacia el extremo apical de las vellosidades al observar que tras la inyección de timidina tritiada a ratones, el isótopo aparecía, transcurridas unas horas, en las células de las criptas, y que al cabo de las 24 horas la timidina tritiada, se detectaba en células situadas hacia la mitad de la vellosidad, encontrando que pasadas 48 horas, las células marcadas se localizaban en el extremo apical de la vellosidad intestinal. Este ciclo de proliferación y migración de las células epiteliales de la vellosidad requiere aproximadamente 48 horas y abarca el mismo intervalo de tiempo en aves y mamíferos (82).

Cuando las células alcanzan el extremo apical de la vellosidad, se desprenden en la luz del tubo diges

tivo, arrastrando con ellas las enzimas digestivas que poseen.

La característica mas distintiva de las células que realizan la absorción, es el borde estriado que recubre la superficie luminal de la célula . Estas pequeñas proyecciones denominadas microvellosidades (microvilli) son las responsables del incremento de la superficie del intestino en un factor de alrededor de 20 . Así, la superficie intestinal humana que en principio se creía de alrededor de 15 metros cuadrados, abarca en realidad unos 300.

La membrana que recubre las microvellosidades constituye la barrera real que deben atravesar las sustancias nutritivas para penetrar en el interior del organismo, gracias a un dispositivo de enzimas y sistemas de transporte integrados en esta membrana de la microvellosidad y no simplemente asociados por algún tipo de interacción lábil. Este es el caso de la fosfatasa alcalina, una enzima de naturaleza glucoproteica, presente en la membrana de la microvellosidad de las células de los villi y ausente o con muy baja actividad en la de las criptas (240).

El intestino delgado del pollo es comparativamente mas corto respecto del de mamíferos y presenta un diámetro uniforme en toda su longitud. La estructura histológica es también similar a la de mamíferos aunque con algunas diferencias tales como la ausencia de vasos linfáticos en la submucosa que rellena la vellosidad, de ma

nera que esta región está únicamente irrigada por capilares sanguíneos. Este hecho está relacionado con el relativamente escaso desarrollo que el sistema linfático adquiere en el pollo, y con la evidencia de que los lípidos absorbidos se vierten a la vena porta y no a los vasos linfáticos , como ocurre en mamíferos (97).

1.C.2.- Absorción intestinal de lípidos

Los esteroides que se encuentran en el lumen intestinal derivan de la dieta, de la secreción biliar, y de la mucosa intestinal, bien por descamación de sus células o por secreción directa (91).

La absorción de colesterol en el intestino está íntimamente ligada a la de otros lípidos, como pone de manifiesto el hecho de que en ausencia de triglicéridos la absorción de colesterol apenas si tiene lugar (98).

Veamos como se lleva a cabo la absorción de grasas en el intestino delgado. Las grasas llegan al duodeno como una emulsión grosera, pero en la porción media y distal, al ponerse en contacto con las secreciones pancreática y biliar, van a sufrir profundos cambios físico-químicos, que continuarán a lo largo del yeyuno.

Las sales biliares son unos potentes detergentes debido a su naturaleza anfipática, lo que les permite solubilizar compuestos mucho menos polares, tales como ácidos grasos , monoglicéridos, colesterol, etc. La solubilización de estos compuestos se realiza gracias a

la formación de micelas, que son de fundamental importancia en el conjunto de la absorción de grasas.

Los componentes primarios de las micelas son ácidos grasos, monoglicéridos y sales biliares, denominándose las micelas así formadas micelas mixtas. Como consecuencia de la formación de tales micelas, las gotas de triglicéridos que en principio alcanzaban diámetros del orden de 5 μm , se convierten en micelas de diámetro uniforme de aproximadamente 3-5 nm.

Durante la formación de las micelas, la lipasa pancreática se liga a los triglicéridos emulsionados. Para su actuación es necesaria la presencia de una proteína denominada colipasa (99), que se liga a la superficie de la micela gracias a la carga neta negativa que le confieren las sales biliares. La colipasa actúa como un ancla para la lipasa pancreática que es la encargada de hidrolizar los triglicéridos del núcleo de la micela. Sales biliares, colipasa y lipasa forman un complejo ternario, que necesita Ca^{2+} para desarrollar la máxima actividad lipolítica (100).

La lipasa pancreática hidroliza preferentemente los ácidos grasos situados en posición 1 y 3 de los triglicéridos, y en menor grado los situados en posición 2. Además de la lipasa, el jugo pancreático contiene una esterasa que es responsable de la hidrólisis completa del 10-15% de los triglicéridos de la dieta. Esta enzima parece ser también la responsable de la hidrólisis de las vitaminas liposolubles (101).

El proceso de la digestión convierte por tanto a las grasas en compuestos mas polares, que son capaces de interactuar con el agua. Los lípidos, en el lumen intestinal, se encuentran en equilibrio entre la fase lipídica, micelar y acuosa (100,102). El desplazamiento del equilibrio hacia la fase micelar se ve favorecido por la presencia de ácidos biliares y determinados valores de pH.

Para satisfacer las necesidades de ácidos biliares en los procesos de absorción, es necesario reabsorber los excretados en la bilis, ya que la producción diaria es mucho menor que la que se necesitaría (en el hombre se necesitan entre 12 y 18 g diarios, y sólo se sintetizan 0.5 g). La reabsorción de las sales biliares se realiza por absorción pasiva, excepto en el íleon que se hace de forma activa (103,104).

Los ésteres de colesterol no son fácilmente incorporados a la fase micelar y por tanto deben ser hidrolizados antes de su incorporación. La forma química en la que el colesterol penetra en el enterocito, es en estado libre. La enzima que cataliza la reacción es la colesterol éster hidrolasa, secretada en el jugo pancreático. Se ha mostrado que esta hidrolasa requiere sales biliares del tipo 3,7,12 trihidroxi para su actividad (105-107).

la absorción de las grasas se realiza de forma pasiva, sugiriéndose la pinocitosis como el mecanismo por el que son transportadas a través de la membrana (108), como ponen de manifiesto numerosos estudios realizados.

a microscopía electrónica. En un trabajo clásico, utilizando cortes intestinales, Strauss (109) demostró por técnicas de microscopía electrónica y autoradiografía que los ácidos grasos pueden penetrar a las células de la mucosa intestinal a 4°C, hasta una zona rica en retículo endoplasmático liso. Resultados de Strauss fueron corroborados posteriormente, comprobándose además que durante la absorción, la membrana externa sufría ciertas modificaciones (110).

Westergaard y Dietschy han postulado la existencia de una fina película de agua que recubriría la mucosa ("Unstirred water layer") y que representaría una importante barrera en el proceso de absorción (111,112). El espesor de esta película de agua sería entre 100 y 400 μm . La misión de las micelas sería la de actuar como vehículos encargados de transportar los productos de la lipólisis hasta la membrana plasmática del enterocito y así poder vencer la resistencia que les opondría esta película de agua. La difusión de la micela a través de esta capa de agua es inversamente proporcional a la raíz cúbica de su peso molecular.

En conjunto, los lípidos pueden ser absorbidos al menos de tres formas distintas: a) la micela puede atravesar la membrana del enterocito en forma intacta; b) al tomar contacto con la membrana puede ocurrir que ésta absorba todos los lípidos componentes de la micela excepto los ácidos biliares que son excretados de nuevo al lumen, y c) la micela no llega a penetrar en la membrana del enterocito, pero los lípidos que la componen, excepto los ácidos biliares, difunden a su través (111).

Los ácidos grasos de cadena corta o media pueden atravesar libremente la película de agua que rodea la mucosa; no obstante, la formación de micelas favorece su absorción. En contraste, el colesterol ve disminuida enormemente su absorción en las condiciones en las que la formación de micelas se ve disminuida (98).

El proceso de transporte de colesterol a través del enterocito es mal conocido. Se sabe que es mucho más lento que el de los glicerolípidos y esto es debido a que el colesterol absorbido se mezcla y diluye con el colesterol estructural de la célula. El tiempo medio de retención del colesterol en el enterocito es de 12 horas. Durante su permanencia y transporte a través de la célula, gran parte del colesterol es esterificado por ácidos grasos, tanto por la acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT), como por la colesterol esterasa (113,114).

1.C.3.- Formación de lipoproteínas en el enterocito. - Transformación del material absorbido.

El colesterol presente en el enterocito puede considerarse de tres tipos de acuerdo con su origen: a) el sintetizado "de novo", b) el absorbido de la dieta o de la secreción biliar y c) el tomado de las lipoproteínas sanguíneas (115,116).

El colesterol presente en el interior del enterocito puede ser excretado al lumen intestinal (donde puede ser reabsorbido o excretado en las heces), o bien transportado al resto del organismo (117). Para su transporte por esta segunda vía, el enterocito lo empaqueta, -

junto con otros lípidos, en una forma física estable, - que es conseguida mediante la formación de unas partículas con un núcleo de triglicéridos y ésteres del colesterol, y una cubierta formada por fosfolípidos y proteínas. Estos agregados, en el caso de los mamíferos, son partículas VLDL y quilomicrones, y en el caso de las aves, unas partículas VLDL de gran tamaño, también denominadas por-tomicrones (118). La composición de estas partículas varía de acuerdo con una gran cantidad de factores. En el hombre, los quilomicrones tienen un tamaño comprendido - entre 50-450 nm y sus constituyentes varían alrededor - de los siguientes valores: 85-95% de triglicéridos, 4-9% de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina), 0.2 a 1.4% de colesterol libre, 0.2-0.7% de colesterol esterificado y en torno al 0.6% de proteínas (119).

La síntesis de los quilomicrones comienza en - el retículo endoplasmático liso, con la acilación de los monoglicéridos procedentes de la absorción, en tanto que el retículo endoplasmático rugoso parece ser el implicado en la acilación del glicerol-3-P (120). Los triglicéridos aparecen como gotas grasas en el interior de las - cisternas del retículo endoplasmático liso, a menudo en expansiones bulbosas.

Los fosfolípidos y proteínas de la cubierta de los quilomicrones son producidos en el retículo endoplas-mático rugoso. A medida que la absorción de grasa progresa, el tipo y el número de gotas aumenta y eventual-mente el retículo endoplasmático se pinza, formando vesí-culas que posteriormente se separan y que contiene en - su interior abundantes lípidos (121). Estas vesículas se

funden con el aparato de Golgi, (donde tiene lugar la adición de azúcares a las proteínas de la cubierta) para ser transportadas a la membrana lateral del enterocito. Posteriormente las membranas se funden y el quilomión es expulsado al espacio intercelular (102), desde donde es recogido por el sistema linfático, en el caso de los mamíferos, o por el sistema porta hepático en el de las aves.

Usando inhibidores de la síntesis de proteínas tales como la puromicina, etionina o acetoxicicloheximida, fué posible producir una abetalipoproteinemia experimental en animales. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de grandes gotas grasas en el interior de la célula de la mucosa y la disminución en la producción de quilomicrones (122-124). Estas observaciones sugieren, que los inhibidores de la síntesis de proteínas interfieren en la absorción de grasas, y que la biosíntesis de proteínas por la mucosa intestinal juega un papel crítico en el conjunto del proceso de absorción de grasas.

1.C.4.- Síntesis intestinal de lípidos

1.C.4.1.- Biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos

Existen tres mecanismos distintos para la síntesis de triglicéridos en la mucosa intestinal. Uno de ellos emplea glicerol-3P y otro dihidroxiacetona fosfato como acil aceptor. Ambas rutas están implicadas en la

biosíntesis de fosfolípidos y triglicéridos, comparten do unas secuencias comunes, y ambas utilizan el acil-CoA como acil donador. La tercera vía es utilizada para formar exclusivamente triglicéridos y se inicia a partir de los monoacilglicerol obtenidos tras la hidrólisis de los triglicéridos de la dieta.

La primera etapa de la formación de los triacilglicéridos es la acilación de los hidroxilos libres del gliceril-fosfato por dos moléculas de acil graso-CoA para formar primero un ácido lisofosfatídico y después un ácido fosfatídico, por la acción de la enzima glicero-fosfato acil transferasa.

La especificidad de los ácidos grasos para la acilación del glicerol-3P ha sido investigada, mostrándose una preferencia hacia los ácidos grasos de cadena larga (125), como se ha puesto de manifiesto con miristato y palmitato en diferentes especies (125,126). Esta incorporación además se ve complicada por el hecho observado por Brindley (127) de que la presencia de ácidos grasos insaturados afecta notablemente a la conversión de ácido fosfatídico a triglicéridos.

El ácido fosfatídico formado en las células de la mucosa intestinal permanece fuertemente ligado a las membranas del retículo endoplasmático (128). El ácido fosfatídico formado en los microsomas puede ser hidrolizado a 1,2-diacilglicerol por acción de la fosfatidato fosfohidrolasa citosólica para formar un diacilglicérido (129). La existencia de una fosfatidato fosfohidrolasa microsómica, también ha sido puesta de manifiesto (130).

La enzima utiliza el ácido fosfatídico como sustrato. - Las actuales evidencias sugieren que la enzima citosólica es la responsable de la mayor actividad asociada con la biosíntesis de glicéridos, como se demuestra al agregar sobrenadante libre de partículas a una preparación de microsomas. Estos hechos, que originalmente fueron - puestos de manifiesto en hígado, también se han demostrado en mucosa intestinal (131). El resultado es la - formación de diglicéridos del tipo 1,2 que pueden ser utilizados para la biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos. En la ruta conducente a los triacilglicéridos, el diacilglicérido formado reacciona después con - una tercera molécula de acil graso-CoA, para rendir un triacilglicérido por la acción de la diacil-gliceril- - acil-transferasa.

La segunda ruta implica la dihidroxiacetona - fosfato, la cual es acilada formando el 1-acil derivado; la acildihidroxiacetona-P es reducida usando NADPH y - rindiendo ácido lisofosfatídico, que posteriormente es acilado para formar ácido fosfatídico. Esta vía fué puesta de manifiesto en mucosa intestinal por Rao y cols. en 1970 (132) y posteriormente confirmada por Brindley en - 1984 (102), aunque todavía no se conoce su importancia relativa.

Uno de los productos mayoritariamente formados en la digestión de los triglicéridos, son los monoacilde rivados junto con los ácidos grasos libres. La primera evidencia sobre la importancia de los monoglicéridos en la biosíntesis de triglicéridos por la mucosa intestinal, fué aportada por Clark y cols. en 1961 (133). Ac

tualmente se sabe que, en gran variedad de especies, - incluidos rata, hombre y también en el pollo, la ruta - de los monoacilglicéridos es la de mayor importancia en la síntesis de triglicéridos por la mucosa intestinal, representando entre el 75-85% del total de triglicéridos formados en dicha mucosa. Los monoacilglicéridos - formados en la digestión intestinal pueden ser directamente acilados por la acil-gliceril-acil-transferasa, - para formar diacilglicéridos, sin aparecer el ácido fosfatídico como intermediario.

La misma enzima acila los 1, 2 y 3-monoacilglicéridos, formando los correspondientes diacilglicéridos (134), aunque mostraba preferencia por los 2-monoacilglicéridos (135). La V_{max} de la reacción era similar tanto para los 1- como para los 2- monoglicéridos; sin embargo la K_m para el isómero 1- era más elevada que - para el 2 (136).

Estudios posteriores demostraron que los 2-monoacilglicéridos eran acilados específicamente en la posición 1, formando 1-2-diacilglicéridos (129).

La síntesis de triacilglicéridos, tanto por la vía del glicerol-3P como por la de los monoacilglicéridos se lleva a cabo principalmente en la fracción microsomal de la célula de la mucosa intestinal. Se ha mostrado que los diacilglicéridos no están en equilibrio con los triacilglicéridos (128).

Una significativa biosíntesis de fosfoglicéridos se realiza por la vía del glicerol-3P, pero no por la vía del monoacilglicerol, que se utiliza preferente-

mente para sintetizar di y triglicéridos. Estas observaciones están sustancialmente de acuerdo con que los diacilglicéridos sintetizados a partir de monoacilglicéridos, no se incorporan a fosfatidil colina, en contraste con los formados por la via del glicerol-3P. Sin embargo, los diacilglicéridos formados por ambas vias, si pueden ser precursores de triglicéridos (129).

Actualmente se piensa que la mayoría de fosfolípidos formados en la mucosa intestinal proceden de la acilación del 1-monoacilglicerofosforilcolina producido en el lumen intestinal por la digestión incompleta de la fosfatidilcolina (102).

Mausbach en 1973 siguió que las enzimas implicadas en la biosíntesis de la fosfatidilcolina y en la acilación de los diacilglicéridos, tenían diferente actividad en células de las criptas que en las células apicales de la vellosidad (137). Posteriormente Negrel y Ailhaud demostraron que la biosíntesis de triacilglicéridos por la via monoacilglicéridos, era más elevada en los microsomas obtenidos de células apicales de la vellosidad, que en la de los obtenidos de células de las criptas (138).

Se ha observado que una dieta rica en triglicéridos incrementa la actividad de algunas enzimas relacionadas con la absorción de triglicéridos, no sólo en las células apicales, sino también en las criptas. Estas observaciones se han confirmado, al mostrarse que una dieta libre de grasas inducía un descenso en la ac-

tividad de la enzima monoacilglicerol aciltransferasa - a lo largo del intestino (139,140). Estos resultados - sugieren que la actividad monoacilglicerol aciltransfe- rása puede ser inducida por sustrato. También se ha po- dido demostrar una activación de esta enzima en íleon - tras la extracción del yeyuno, y la subsecuente alimen- tación con una dieta rica en grasas (141).

Se ha demostrado que el ayuno reducía notable- mente la capacidad del hamster para esterificar ácidos grasos (142), pensándose que esto puede ser debido al descenso en estas condiciones de los precursores del - glicerol. La activación de los ácidos grasos se ha pen- sado que también juega un papel fundamental en la regu- lación de la absorción de grasas, como se ha puesto de manifiesto durante el ayuno nocturno, en el que se ha - observado un descenso en la actividad de la monoacil- - glicerol-acil-transferasa (143).

Se han descrito algunas manipulaciones hormo- nales que influyen en la biosíntesis de los acilglicero- les. La adrenalectomía ha mostrado un descenso en la ac- tividad de acil-graso-CoA ligasa, la mono y diacilglice- rol acil transferasas y en la esterificación del glice- rol-3P por la mucosa intestinal (144,145).

Puesto que la distribución celular y subcelu- lar de la ruta del 3-fosfoglicerato y del monoacilglice- rol es la misma, se ha sugerido la interrelación en es- tas dos vías como un posible mecanismo de control en la biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos (146). En efecto, se ha observado una inhibición de la acilación

del glicerol-3P en presencia de monoacilgliceroles, tanto en cortes de intestino como en microsomas. Que era una inhibición directa y no una competencia por la disponibilidad del acil-CoA, se mostró al comprobar que el análogo del 3-monoacilglicerol, el 3-éter monoacilglicerol (que no puede ser acilado por las acil transferasas) - también inhibía la reacción (147). Este mecanismo de control permite a la célula de la mucosa intestinal sintetizar triglicéridos por una u otra vía, en función de la disponibilidad o no de monoacilgliceroles.

1.C.4.2.- Biosíntesis intestinal de colesterol y su regulación.

Como anteriormente hemos indicado, la mucosa intestinal juega un papel clave en el metabolismo del colesterol, tanto por ser la responsable de la absorción del colesterol de la dieta, como por ser uno de los órganos más activos en su síntesis "de novo".

La estructura fisiológica y anatómica del intestino es compleja, debido a las notables diferencias existentes en su morfología y función, tanto horizontalmente a lo largo de su longitud, como verticalmente a lo largo del eje de la vellosidad. Esto sugiere la posibilidad de que la síntesis de colesterol en estas diferentes regiones cumpla funciones distintas; así, el colesterol sintetizado en las células maduras de la vellosidad se dedicaría fundamentalmente a ser empaquetado en quilomicrones (148), en tanto que el sintetizado por las células de las criptas, se destinaría a satisfacer -

las necesidades derivadas de la alta tasa de división - registrada en esta región de la vellosidad (149).

Dietschy, usando agua tritiada como sustrato, ha encontrado que, tanto "in vitro" como "in vivo", las células inferiores de la vellosidad y las de las criptas, tanto en yeyuno como en íleon, eran las más activas en la síntesis de esteroides precipitables con digitonina (150), informando de una alta tasa de síntesis para las restantes células de la vellosidad. Sin embargo, Merchant y Heller, habían informado anteriormente que las células superiores de la vellosidad incorporaban ^{14}C -acetato más activamente a esteroides, que las células de las criptas (151,152).

Respecto de la máxima actividad colesterogénica a lo largo del intestino, Stange y Dietschy (150) informan que el íleon de rata es la región más activa en la incorporación de agua tritiada a DPS. Sin embargo otros autores (153) utilizando ^{14}C -acetato como precursor, encontraron que en conejo la región media del intestino era la más activa en la síntesis de colesterol.

Con la información que actualmente se dispone cabe pensar que, en estudios llevados a cabo tanto "in vitro" como "in vivo", los valores mostrados respecto de la contribución relativa de cada uno de los órganos o regiones del intestino a la síntesis global de colesterol, dependen tanto de la técnica empleada como de la especie estudiada. En cerdo, usando acetato como precursor, se ha demostrado que hígado e intestino delgado son los órganos más activos de la síntesis de colesterol

(154). En cabra, el tejido adiposo y el intestino son los órganos que exhiben mayor tasa de síntesis de colesterol, mientras que el hígado posee una tasa aún menor que cerebro (155,156). De la misma manera Taylor y cols (157) han hallado en el hombre tasas comparables de incorporación de acetato a colesterol en cortes de hígado e intestino, en contraposición a los resultados mostrados por Krumkied y Ho (158) y Angel y Bray (159), que en el mismo origen, encuentran que el hígado es el órgano preponderante en cuanto a la colesterogénesis.

La tasa de síntesis de colesterol en el intestino, está aparentemente sometida a una compleja regulación, que viene determinada por la cantidad de estero--les absorbidos desde el lumen intestinal, el tomado en forma de lipoproteínas o el requerido por la célula para satisfacer sus necesidades (92,93,116,148-150).

En tanto que la relación entre el colesterol de la dieta y su biosíntesis en el hígado se ha establecido de forma inequívoca, la regulación de la colesterogénesis intestinal por el colesterol de la dieta, ha sido ampliamente discutida (160-162). Sin embargo, evidencias actuales ponen de manifiesto una clara supresión de la síntesis intestinal de colesterol debida al colesterol intraluminal, en distintas especies, incluidos hombre y rata, siendo más manifiesta en aquellos que son más sensibles a la hipercolesterolemia como ocurre con el hamster, pollo y conejo (148,163-166). Con una dieta rica en colesterol se ha comprobado que aumenta la síntesis de ácidos biliares y los niveles de colesterol en las células intestinales (167), pensándose en

principio que estos dos efectos podrían ser las razones que explicaran la inhibición de la síntesis, pero Schneider y cols (168) no pudieron demostrar una inhibición de la biosíntesis de colesterol por sales biliares en cultivos de células intestinales.

La colestiramina, como anteriormente hemos mencionado, es una resina de intercambio iónico que no puede ser metabolizada ni absorbida en el tracto gastrointestinal, pero que actúa secuestrando ácidos biliares del lumen intestinal e incrementando su excreción fecal.

El efecto producido por una dieta suplementada con colestiramina sobre la síntesis de colesterol varía notablemente dependiendo del órgano y de la especie estudiada. Así, en el cobaya la colesterogénesis se vió notablemente aumentada tanto en pulmón como en hígado; sin embargo en íleon, los incrementos encontrados en eran significativos (169).

El efecto hipocolesterolémico de la colestiramina en el cobaya, es mucho mas elevado que el descrito en otras especies. En pollo (170) y en humanos, (171), la alimentación con colestiramina disminuye los niveles plasmáticos de colesterol por debajo del 25% y sin embargo no tiene efecto en ratas, a las que sí afecta en la síntesis de colesterol tanto intestinal como hepática, provocando un aumento en la actividad colesterogénica (172).

Dado que en ratas alimentadas con colestiramina, los niveles plasmáticos de colesterol apenas si su-

fren variación, los niveles de síntesis de colesterol, tanto en hígado como intestino, se deben incrementar lo suficiente como para compensar las pérdidas fecales tanto de ácidos biliares como de colesterol. En cambio, en el cobaya, los niveles plasmáticos de colesterol disminuyen drásticamente tras la alimentación con colestiramina debido a que al no aumentar la colesterogénesis intestinal en estas condiciones, el incremento de actividad colesterogénica en el hígado, no es suficiente para compensar las pérdidas fecales (169).

De cualquier manera, el secuestro de ácidos biliares por la colestiramina, es aceptado como un potente factor estimulante de la colesterogénesis, tanto intestinal como hepática, aún cuando en determinadas especies como el conejillo de indias y el cerdo no se ha podido poner de manifiesto (173,174). Dicho secuestro incide negativamente sobre la absorción de grasas y colesterol por la célula intestinal y su posterior transporte hasta la linfa, como pone de manifiesto el acúmulo de grasa detectado en el enterocito tras la alimentación con una dieta con colestiramina (175).

Las fibras son sustancias derivadas de las plantas, que no pueden ser digeridas en el intestino. Se ha constatado que una dieta que incluya fibra vegetal en su composición, reduce la síntesis de colesterol en el intestino. En rata, una dieta prolongada conteniendo el 10% de pectina (P/P) reduce la síntesis de colesterol hasta un 33% y un 52% en yeyuno e íleon, respectivamente, siendo las células de las criptas las que mostraban una reducción más acusada (176).

El clofibrato y probucol son drogas a las - que se le reconoce un efecto hipocolesterolémico. Así, el clofibrato reduce principalmente los niveles de VLDL en el hombre mientras que el probucol reduce más eficazmente los niveles de LDL y HDL en el hombre que los de VLDL. Se ha comprobado en rata, que en ensayos "in vitro", el clofibrato disminuye la síntesis de colesterol y ácidos grasos en células de la vellosidad de yeyuno, pero no en las de las criptas (177).

Si bien la información de que se dispone respecto a la regulación hormonal de la colestero^génesis hepática es amplia, la referente a intestino es mas escasa. Feingold y col. (178), usando agua tritiada para evaluar la síntesis de "novo" de colesterol, informan que en ratas con "diabetes mellitus" inducida por estreptozotocina, la colestero^génesis intestinal se vé incrementada de dos a tres veces respecto de ratas controles, comprobándose así mismo que el colesterol presente en el conducto torácico se había incrementado hasta cuatro veces (179). En el mismo sentido Goodman y col (180) obtuvieron anteriormente los mismos resultados, a la vez que comprobaron que el glucagón podía reducir la colestero^génesis intestinal hasta un 42%, sugiriendo que el efecto podría ser mediado por nucleótidos cíclicos.

Las lipoproteínas plasmáticas circulantes ejercen una gran influencia sobre el metabolismo del colesterol en el interior de la célula. Al menos en rata y hamster, el intestino es el segundo órgano en importancia en la toma de LDL plasmáticas, tanto dependiente de la presencia de receptores de membrana como independient

te (181). También se ha puesto de manifiesto receptores de membrana capaces de reconocer HDL en la membrana basolateral del enterocito (182).

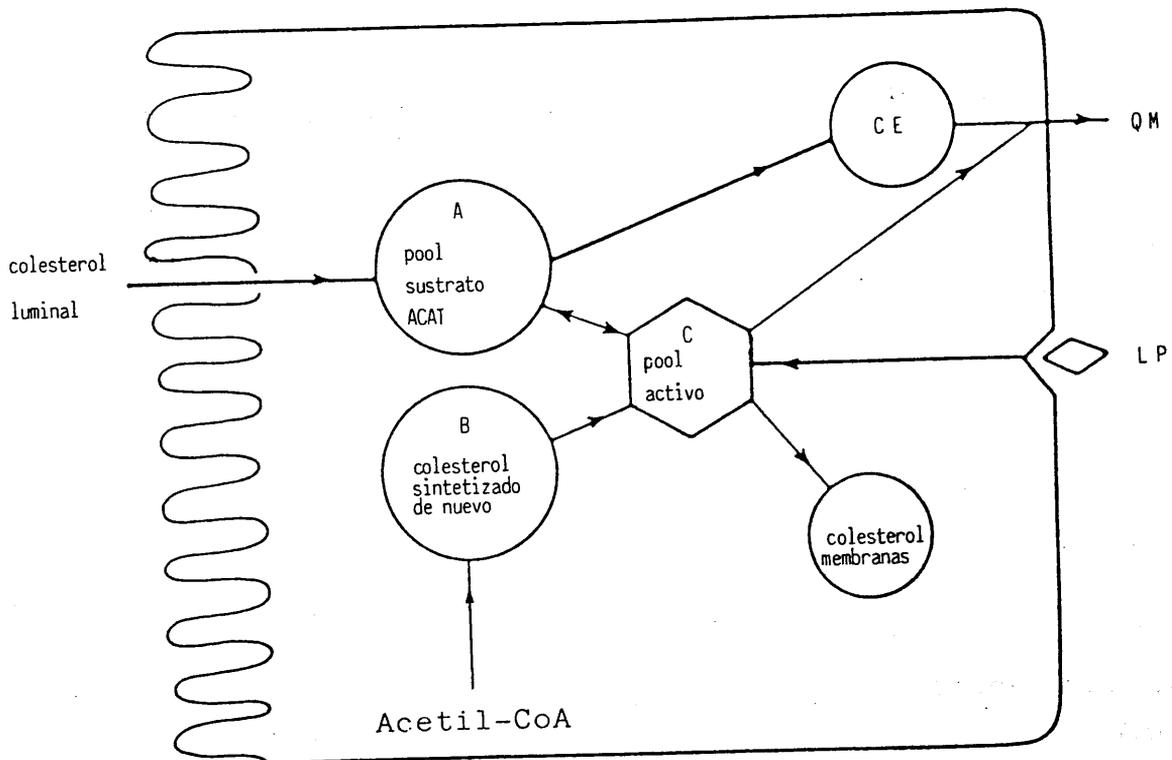
En rata se ha comprobado que el colesterol sintetizado por el enterocito es cuantitativamente más importante que el tomado por LDL (183). Stange y Dietschy (183) informan que la toma de LDL por el intestino no varía significativamente en longitud a pesar de que existen regiones diferenciadas en este órgano en cuanto a su capacidad colesterogénica (máxima en la porción terminal del duodeno e íleon y proximal del yeyuno de rata). Respecto del eje vellosidad-cripta, al menos en rata y hamster, el 70% de las LDL tomadas por el intestino, corresponde a la región inferior de la vellosidad y de las criptas.

Cuando el flujo de colesterol a través de las células epiteliales de la mucosa es alterado, por ejemplo por una dieta rica en triglicéridos o por la presencia de colestiramina, que pueden aumentar hasta siete veces la síntesis de colesterol intestinal, la toma de LDL por el intestino permanece inalterada (183). Estos estudios sugieren que en el intestino, la síntesis local de colesterol es capaz de atender las demandas celulares de este compuesto, tanto en condiciones normales como en aquellas en las que el flujo normal de colesterol se vé alterado.

Recientemente distintos autores han postulado la existencia de distintos "pool" de colesterol en el enterocito, que no están en equilibrio entre sí, utilizándose cada uno de ellos para satisfacer distintas ne-

cesidades (184).

Como se indica en el esquema 4, el colesterol sintetizado "de novo" pasaría a formar parte íntegramente de un "pool" de colesterol metabólicamente activo, - al cual se integrarían, aunque en menor grado, el colesterol tomado de las partículas LDL y parte del colesterol absorbido de la dieta. La mayor parte del colesterol proveniente de esta última fuente sería esterificado y se utilizaría como componente del núcleo de los quilomicrones. El colesterol del "pool" metabólicamente activo sería utilizado para atender a las restantes necesidades celulares, a la vez que una pequeña cantidad se destinaría a la formación de quilomicrones..



Esquema 4

1.C.4.2.1.- Importancia de la HMG-CoA reductasa intestinal

La actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, se corresponde estrechamente con la velocidad de síntesis de colesterol en una gran variedad de condiciones. Así, cuando la capacidad de síntesis de colesterol hepático se modifica profundamente por manipulaciones en la dieta, en cada instante la correlación entre la síntesis de colesterol y la actividad reductasa es sorprendente (185). Estas observaciones, junto con los resultados de diversos autores (186), permiten asegurar que la reductasa es un punto clave en el proceso de regulación de la biosíntesis de colesterol, comportándose como tal bajo muchas condiciones fisiológicas.

Los trabajos de Chin y col (187) han revelado que la reductasa es una glucoproteína integral de membrana de 97 Kd, constituida por 887 aminoácidos, cuya secuencia también descifraron. Recientemente Liscum y col (188) han informado que existen dos "dominios" en dicha molécula: uno hidrofóbico constituido por el tercio -NH₂-terminal y otro hidrofílico integrado por los dos tercios restantes. La porción hidrofóbica de la molécula se encuentra incrustada en la membrana del retículo endoplasmático y unida a ella por siete puntos de anclaje. La porción de proteína comprendida entre el sexto y séptimo punto de anclaje se proyecta hacia el lumen del retículo endoplasmático, encontrándose glucosilada por una cadena oligosacáridica. Los dos tercios restantes, correspondientes al extremo CoOH-terminal, pueden ser liberados de la membrana por acción proteolítica y aparece como un fragmento soluble de 53 Kd, integrado por

548 aminoácidos, que retiene toda la actividad catalítica de la holoenzima (108).

Diversos estudios de la HMG-CoA reductasa de hígado e intestino de rata, indican que ambas enzimas son similares. Las dos presentan ritmo circadiano, tienen cinéticas similares, requieren NADPH y reaccionan con anticuerpos de reductasa de hígado (189,190).

Los estudios de Sugano y col (191) revelan que las propiedades de la HMG-CoA reductasa de intestino de rata son muy similares tanto en células de las vellosidades como en células de las criptas, comprobando que tanto los valores del pH óptimo como los de K_m de la enzima de ambos tipos celulares, son los mismos (7.0-7.2 y 41.7 μM respectivamente). Estos resultados le llevan a pensar que se trata de la misma enzima.

Existe controversia acerca de cual es la región del intestino que presenta la máxima actividad reductasa. Panini y col (192) y Sugano y col (193), encuentran una actividad específica creciente en el sentido vellosidades-criptas. En cambio Muroya y col (194) y Merchant y Heller (151), encuentran la máxima actividad reductasa en las células superiores de la vellosidad. En cambio, al menos en rata, parece ser que hay acuerdo a la hora de considerar el íleon como la región que presenta la máxima actividad reductasa (191,193,194).

En células de aves y mamíferos, la HMG-CoA reductasa se encuentra exclusivamente en la membrana de la fracción microsomal de los homogenados celulares. Alrededor de un 80% parece estar asociada al retículo

endoplasmático liso y aparato de Golgi, aunque estudios mas recientes sugieren que la reductasa se presenta en el retículo endoplasmático con alto contenido en ribosomas (195). La localización subcelular de la actividad -HMG-CoA reductasa intestinal, plantea bastantes problemas, al parecer, por la interferencia del mucus en el proceso de subfraccionamiento (192). No obstante la localización microsomal de esta enzima parece estar suficientemente probada (196).

La existencia de un ritmo diurno en la actividad de la HMG-CoA reductasa, fué puesto de manifiesto a final de los años 60, siendo posteriormente confirmada por distintos autores en distintas especies y orígenes, entre ellos, hígado e intestino de rata y pollo (197, -198), no habiéndose podido poner de manifiesto en humanos.

Las causas del ritmo parecen deberse a una -variación en la síntesis y degradación de la enzima (199, 200), aunque algunos autores también apunten los cambios de luz, el tipo de dieta o la acción de diversas hormonas como otros posibles factores que incidirían en el -ritmo, actuando a nivel de la síntesis-degradación ó activación-inhibición (201).

En la mucosa intestinal, la actividad específica de la reductasa, no varía en función de la edad o el sexo de las ratas. Estas diferencias respecto de otros órganos (hígado, cerebro) pueden ser debidas a un distinto mecanismo de control operativo, sobre la regulación en la actividad de la enzima (202).

La regulación de la HmG-CoA reductasa es compleja, y se han descrito varios mecanismos para explicar las variaciones en su actividad.

Uno de los mecanismos de regulación es el denominado modulación covalente consistente en una modificación posttranscripcional mediante la interconversión de las formas activa e inactiva de la enzima.

En 1973 Beg y col (203) informaron que la reductasa hepática se inactivaba "in vitro" cuando los microsomas se incubaban con la fracción citoplasmática en presencia de ATP y Mg^{++} . Posteriormente Nordstrom y col (204) observaron que la HMG-CoA reductasa, inactivada en una reacción ATP dependiente, podría reactivarse mediante incubación con una enzima citoplasmática procedente de hígado de rata y en presencia de EDTA. La actividad de esta enzima era totalmente inhibida por FNa 50mM, un inhibidor de fosfatasa, sugiriendo que la reactivación incluía una defosforilación de la enzima previamente fosforilada.

En 1979, Field y col (205) mostraron que la actividad de la HMG-CoA intestinal era incrementada cuando se incubaba en presencia de FNa. Recientemente Oku y col (206), informan que la HMG-CoA reductasa intestinal puede ser regulada por un mecanismo de fosforilación-de fosforilación, aunque manifiesta que la enzima intestinal es menos sensible a este mecanismo regulador que la enzima hepática y que la inactivación por Mg^{++} ATP era relativamente baja.

Aunque ha quedado claramente establecido "in vitro" el mecanismo regulador mediante fosforilación-des-

fosforilación, el auténtico significado de su papel "in vivo" permanece aún por esclarecer.

La enzima HMG-CoA reductasa puede estar regulada por un control "feed-back" por el propio colesterol. Estudiando este efecto, Higgins y col (207) observaron que 6 horas después de ingerir colesterol la actividad reductasa era relativamente baja comparada con la de animales controles; sin embargo, la cantidad de enzima permanecía constante. Al cabo de 12 horas se comprobó que tanto la actividad como la cantidad de enzima habían descendido de forma paralela. Estos datos sugirieron - que la alimentación con colesterol tenía un efecto doble sobre la HMG-CoA reductasa: por un lado, una inactivación inmediata y por otro, una reducción de la síntesis de la enzima a más largo plazo. Los mecanismos por los que el colesterol regula la actividad reductasa de forma inmediata no se conocen exactamente, considerándose improbable una inhibición alostérica.

El que en determinados cultivos celulares el colesterol presente en el medio no afectara en la actividad reductasa, ni a la tasa de síntesis de esteroides, - (208), pero sí la influenciaran ciertos derivados oxigenados del colesterol (7-cetocolesterol, y 7α , 7β y 25-hidroxicolesterol) indujo a Kandutsch y col (209) a emitir la hipótesis en la que sugieren que serían estos oxisteroides, en vez del colesterol, los que actuarían como reguladores naturales de la reductasa y por tanto de la síntesis de colesterol.

En este aspecto debemos destacar que el efec-

to del colesterol usado habitualmente en experimentación, es superior al del colesterol altamente purificado, habiéndose observado la acumulación de derivados oxigenados del mismo, cuando el producto se mantiene cierto tiempo al aire.

Recientemente Panini y col (210) han informado que en cultivos de células epiteliales de intestino de rata, el 3- β -[2-(dietilamino)etoxi] adrost-5-en-17-uno (V18666A), un inhibidor de la 2,3-oxidoescualeno ciclasa, provoca una acumulación celular de escualeno 2,3:22, 23-dióxido, a la vez que causa una progresiva inhibición de la actividad reductasa. Estos resultados les han sugerido que oxiesteroles derivados del escualeno 2,3:22, 23 dióxido, puedan actuar como reguladores fisiológicos de la reductasa, a la vez que el efecto regulador de las LDL sobre la mencionada enzima podría estar mediado por estos mismos oxiesteroles.

Tanaka y col (211) estudiando el mecanismo de acción del 25-hidroxicolesterol en cultivos de mieloblastos de pollo, encuentran que la inhibición de la reductasa por este compuesto es del 80% al cabo de 60 min, comprobando que este descenso de la actividad, no es debido a un incremento de la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la molécula enzimática. Sin embargo, se ha encontrado un aumento del 350% en la degradación de la enzima, así como un descenso de un 72% en la tasa de síntesis de la reductasa. Estas alteraciones en las tasas de síntesis y degradación de la enzima, ocurrían entre 10-30 min después de la adición del 25-hidroxicolesterol, y no iban

asociados concomitantemente a cambios en los niveles de mRNA de la reductasa. Todos estos datos sugieren que el mecanismo de acción del 25-hidroxicolesterol debe ser a nivel de la regulación de la traducción del m-RNA.

Jenke y col (212) usando microsomas de hígado de ratas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol al 3%, y usando técnicas de inmunotitulación - con anticuerpos monoespecíficos de la HMG-CoA reductasa, informan que la regulación "in vivo" a corto plazo de esta enzima por el colesterol de la dieta, así como los cambios detectados en el ritmo diurno de la misma, son debidos exclusivamente a cambios en la cantidad de proteína enzimática.

Aunque, como acabamos de indicar, se aceptó - que el colesterol regula la HMG-CoA reductasa mediante un mecanismo que afecta a la velocidad de síntesis o de degradación de la enzima, parece probable que lo que también ocurra sea un cambio en la concentración de colesterol en la membrana, en la que se localiza la HMG-CoA reductasa, provocando una modificación inmediata en su actividad.

Teniendo en cuenta el importante papel que - juega el colesterol sobre la fluidez de la membrana, - varios autores han estudiado el efecto de la supresión de colesterol de membranas de eritrocitos humanos por - incubación con liposomas de fosfatidilconina (213). Los resultados muestran que las actividades enzimáticas de tres quinasas ligadas a membrana, se ven afectados por la falta de colesterol

La rigidez de la membrana puede ser provocada tanto por colesterol libre como esterificado. Sin embargo, la producida por este último es más estable, pues a diferencia del colesterol libre, se necesita el concurso de enzimas lisosomales para su hidrólisis, para que una vez en forma libre pueda ser transferido fácilmente a otras membranas o estructuras (214). Se ha observado que en ratas alimentadas con una dieta suplementada con colesterol al 4% durante un mes, aparecen modificaciones en la estructura y función de los microsomas hepáticos (215).

El colesterol exógeno presente en el enterocito puede proceder de dos fuentes: el absorbido del lumen intestinal o el tomado de las lipoproteínas plasmáticas. Tanto uno como otro provocan una inhibición de la actividad reductasa intestinal (116,148).

Brown y col (216) mostraron que las LDL del suero inhibían la actividad reductasa en fibroblastos humanos, pero no encontraron este efecto en las restantes lipoproteínas plasmáticas. De nuevo, Brown y Goldstein (217), usando ^{125}I -LDL, midieron en distintas condiciones la cantidad de LDL radiactiva ligada a los receptores de superficie en cultivos de fibroblastos humanos y encontraron que concentraciones crecientes de LDL en el medio de cultivo, reducían progresivamente la capacidad de las células para tomar LDL, debido a un descenso en el número de receptores, y como consecuencia también se reducía la tasa de transferencia de lipoproteínas y colesterol al interior de la célula (217).

En cultivos de células de mucosa intestinal de conejo, Stange y col (218) han puesto de manifiesto que

el grado de inhibición de la actividad reductasa por LDL dependía de su concentración en el medio. Con concentraciones de 0.2 mM y 1.0 mM, la supresión de la actividad fué del 51% y el 75% respectivamente. En cambio, la respuesta de la reductasa a HDL y VLDL era bifásica: - concentraciones entre 0.1 y 0.3 mM provocaban una estimulación de la actividad (2-3 veces respecto de los valores controles) y concentraciones más elevadas provocaban una supresión. Pero HDL y VLDL obtenidas de conejos hipercolesterolémicos a causa de la alimentación con una dieta rica en colesterol, sólo provocaban una pequeña activación de la enzima (218).

De la misma manera que el colesterol, la dieta con ácidos biliares produce una inhibición de la síntesis de colesterol y de la actividad HMG-CoA reductasa, en hígado e intestino (219). Shefer y col observaron una pronunciada reducción de la actividad reductasa en mucosa intestinal de rata cuando la dieta fué suplementada con colesterol al 2% y ácidos biliares al 1% (219). Consecuentemente, cuando el contenido en ácidos biliares de la circulación enterohepática se redujo, se observó un incremento en la síntesis hepática de colesterol y en la actividad HMG-CoA reductasa.

Borthz y Steele (220) encuentran una correlación inversa entre el contenido en ácidos biliares en el hígado y la actividad HMG-CoA reductasa; sin embargo no detectan cambios en el contenido en colesterol.

Kandutsch y Chen (221) observaron una fuerte inhibición de la reductasa cuando al medio de cultivo -

de hepatocitos aislados se le agregó ciertos oxiesteroles, sin embargo no se encontró ningún efecto cuando los oxiesteroles fueron sustituidos por ácidos biliares.

Estudios "in vitro" han puesto de manifiesto una inhibición en la actividad HMG-CoA reductasa cuando se incubaba en presencia de ácidos biliares, sugiriendo que dicho efecto es debido al poder detergente de estos ácidos biliares y no a que sean unos reguladores directos de la enzima (222).

Schneider y col (223) han encontrado una activación de la HMG-CoA reductasa de mucosa intestinal de conejo cuando estas células se mantenían en un medio de cultivo con ácidos biliares durante 24 h, sugiriendo como causa, la disminución del contenido en colesterol de la célula, debido al efecto detergente de estos ácidos, puesto que el efecto fué bloqueado en presencia de colesterol.

La colestiramina activa la HMG-CoA reductasa, intestinal y hepática debido a su capacidad de secuestrar ácidos biliares e inhibir la absorción intestinal de colesterol. En el hígado, al activar también la colesterol 7 α -hidroxilasa, parte del colesterol del hepatocito se desvía hacia la formación de ácidos biliares, induciendo el aumento de actividad de la HMG-CoA reductasa (224). En el intestino, el secuestro de ácidos biliares provoca una disminución en la absorción del colesterol luminal, por lo que los niveles de colesterol en el enterocito disminuyen, y por tanto la actividad HMG-CoA reductasa se incrementa (225).

El grado en que se incrementa dicha actividad dependerá de la importancia relativa de cada órgano en la colesterogénesis del organismo. Así, en el cobaya, en el que la actividad HMG-CoA reductasa intestinal es más elevada que la hepática, la dieta con colestiramina aumenta la actividad HMG-CoA reductasa hepática hasta 13 veces - respecto de los valores normales, en cambio apenas si afecta a la reductasa intestinal (225). Por el contrario, en rata, la actividad colesterogénica del intestino se incrementa de forma mucho mas acusada que la del hígado, tras impedir el vertido de la vesícula biliar al lumen - intestinal (234).

Tanaka y col (226) tratando de aislar la HMG-CoA reductasa para su purificación, sometieron a ratas a una dieta suplementada con colestiramina y con colestiramina y mevinolina. La mevinolina es un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa, análogo a la compactina, pero mucho más activa. Estos autores observaron, mediante técnicas de inmunotitulación, que en ratas alimentadas con colestiramina el incremento de la actividad reductasa se debía a una activación de la enzima, en tanto que en las ratas alimentadas con colestiramina y mevinolina el incremento de la actividad reductasa, se debía exclusivamente a un aumento de la cantidad de enzima.

La mayoría de los estudios realizados a cerca del efecto de distintas dietas sobre la actividad HMG-CoA reductasa, se han hecho sobre la reductasa hepática, siendo escasa la información disponible a cerca de reductasa intestinal.

Sugano y col (193) han observado en rata, - que con una dieta rica en grasas, la actividad reductasa era más elevada en las células superiores de la vellosidad intestinal, cuando se comparaba con la de ratas alimentadas con una dieta libre de grasas. Oku y col. (227) informan que la HMG-CoA reductasa de yeyuno incrementa su actividad cuando las ratas son alimentadas con una dieta que contenga hasta un 10% de grasa (P/P). Sin embargo no observaron modificaciones en la de íleon, estando esto de acuerdo con el hecho aceptado de que la absorción de grasas tiene lugar mayoritariamente en yeyuno.

Se sabe que la actividad HMG-CoA reductasa de hígado se ve influenciada por el grado de saturación de las grasas que constituyen la dieta, sin embargo este efecto no se ha podido poner de manifiesto en la enzima intestinal (227).

Poco se sabe de la influencia hormonal sobre la actividad de la HMG-CoA reductasa intestinal. Sin embargo a este respecto se puede destacar que Young y col (228) han observado que en ratas con diabetes inducida experimentalmente, la actividad específica de la reductasa hepática descendió notablemente. Por el contrario, bajo estas mismas condiciones, la enzima intestinal incrementó su actividad 2,5 veces respecto de los controles, pasando el intestino a ser en estas condiciones el órgano más activo en la síntesis corporal de colesterol.

1.C.3.4.s.- Importancia de la PP-MVA descarboxilasa intestinal.

En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto, que además de la HMG-CoA reductasa, otras enzimas implicadas en la biosíntesis de colesterol pueden participar en el proceso global de la regulación de su síntesis.

La primera sugerencia de que la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa juega algún papel regulador en la biosíntesis de esteroides, fué realizada por Ramachandran y Shah (229). Trabajando con $[1-^{14}\text{C}]$ -MVA, estos autores mostraron un descenso progresivo de la actividad descarboxilasa de hígado de rata, durante el periodo de lactancia, seguido de un aumento de la actividad tras el destete. Este cambio, a su vez, era extremadamente parecido al patrón observado en la incorporación de MVA a lípidos insaponificables.

Por otra parte, la alimentación tras el destete con una dieta suplementada con colesterol al 1% , impide el aumento esperado en la actividad. Estos resultados parecían sugerir que la descarboxilación de ácido mevalónico constituía un paso limitante tanto en animales lactantes como en destetados, y que los niveles bajos de la actividad descarboxilasa en hígado de ratas lactantes, estarían asociados al elevado contenido en colesterol de la leche materna.

Recientemente se ha purificado la descarboxi

lasa de hígado de pollo, obteniéndose una forma muy estable y altamente purificada (230). Aparece como un dímero con un peso molecular de 85.400 ± 1.941 , que no requiere la presencia de protectores -SH para su actividad o estabilidad. La enzima requiere ATP de forma específica y la presencia de iones Mg^{++} para una actividad efectiva. La banda de pH óptimo se encuentra entre los valores 4 y 6.5. Los valores de Km obtenidos fueron de 0.0141 mM y 0.504 mM para el PPMVA y ATP respectivamente.

La existencia de un ritmo circadinao en la actividad descarboxilasa es un tema controvertido. Sin embargo, los resultados obtenidos recientemente por Jabalquinto y col (231) y González-Pacanowska y col (232, -233) no muestran cambios apreciables en la actividad de la enzima, de hígado, riñón, e intestino a lo largo de un período de 24 horas.

Durr (234), estudiando el efecto del ayuno sobre la descarboxilación del $[1-^{14}C]MVA$ en hígado, yeyuno y tejido adiposo de rata, observa una reducción en la cantidad de CO_2 desprendido en todos los casos, restableciéndose los niveles de actividad con la realimentación. González-Pacanowska y col (233,235) usando $[2-^{14}C]$ mevalonato-5-pirofosfato como sustrato para medir la actividad de la enzima, encuentran que el ayuno provoca en la descarboxilasa intestinal y hepática de pollo, un descenso de actividad, y que la realimentación restablece los valores controles.

Las variaciones de la actividad descarboxilala

sa a lo largo del desarrollo embionario en pollo han sido estudiados por Marco y cols (236), informando que en cerebro se observa un aumento de la actividad bastante acusado, entre los días 13 y 18, disminuyendo ligeramente a continuación. Dado el estrecho paralelismo entre el perfil de la actividad descarboxilasa y el contenido en colesterol libre en el cerebro, se ha propuesto un papel importante para esta enzima en la regulación de la colesterogénesis durante la mielinización. En cambio la de hígado se mantuvo constante a lo largo de todo el desarrollo embionario y con valores absolutos inferiores a los de cerebro.

González-Pacanowska y cols (233) han estudiado la actividad descarboxilasa intestinal a lo largo del desarrollo neonatal del pollo, observando que dicha actividad aumenta ligeramente hasta el octavo día, disminuyendo progresivamente a partir de ese punto, hasta el día 18, último día estudiado.

Un estudio detallado acerca de la acción de determinados compuestos fenílicos y fenólicos fué llevado a cabo por Bhat y Ramasarma (237), observando que los ácidos p-cumárico, isoferúlico y ferúlico ejercen una significativa inhibición sobre la descarboxilación del ácido mevalónico en hígado de rata, sugiriendo que el grupo fenil vinilo fuera el responsable de la inhibición. Estudios cinéticos mostraron que algunos de los compuestos fenólicos compiten con el sustrato de la PP-MVA descarboxilasa, mientras que otros inhiben de forma no competitiva.

El efecto de determinados factores nutricionales sobre la descarboxilasa ha sido descrito recientemente en rata (238) y en pollo (239,252). Así, la actividad descarboxilasa disminuye en hígado e intestino tras suministrar una dieta suplementada con el 2% de colesterol y se incrementa con una dieta suplementada con colestiramina. En riñón por el contrario, tanto el colesterol como la colestiramina carecen de efecto.

Durr y Murad (253) estudiaron la descarboxilación del PPMVA en mucosa intestinal de rata, perro y gato. La adición de ácidos biliares a la dieta, tanto libres como en su forma conjugada, produjo una significativa inhibición de la PPMVA descarboxilasa.

En ratas con diabetes inducida experimentalmente, se observó que los niveles de la actividad descarboxilasa disminuyeron tanto en hígado como en riñón, no disponiendo de información acerca del intestino (238).

1.C.5.- Esterificación intestinal de colesterol. Importancia de la ACAT.

La entrada de colesterol libre al enterocito, ya sea procedente del lumen intestinal o de las lipoproteínas plasmáticas, reduce su tasa de síntesis y aumenta la tasa de esterificación con ácidos grasos. Dos enzimas se han implicado en este último proceso: una colesterol esterasa de origen pancreático y la acil-CoA colesterol acil transferasa (ACAT).

Evidencias actuales ponen de manifiesto que de entre las dos enzimas, la ACAT es la de mayor importancia en el mencionado proceso de esterificación, relacionándose la esterasa con procesos de hidrólisis y entrada de colesterol al enterocito, y sospechándose que pueda ser contaminante de origen luminal en las preparaciones celulares (254,255).

El colesterol esterificado producido en el enterocito es destinado fundamentalmente, una vez satisfechas las necesidades de la propia célula, a ser exportado al resto del organismo a través de los quilomicrones.

Es bien conocido que la ACAT es una enzima microsomal, cuya actividad está asociada al retículo endoplasmático rugoso, aunque los ésteres de colesterol formados se detecten fundamentalmente en el retículo endoplasmático liso (256). Se ha sugerido que los ésteres de colesterol sintetizados en el retículo endoplasmático rugoso son transferidos al liso, cuyas membranas actuarían como una trampa para estos ésteres. En la célula, este proceso podría constituir el primer paso en el empaquetamiento de los ésteres de colesterol en los quilomicrones o VLDL (256).

Muchas de las propiedades de la ACAT, así como los mecanismos que regulan su actividad, se han puesto de manifiesto mediante técnicas de solubilización y extracción de la enzima de la membrana microsomal y su posterior reconstitución en membranas de com-

posición lipídica conocida. Usando esta técnica, Mathur y Spector (257) observaron que la actividad de la enzima se veía afectada por la naturaleza de los fosfolí--pidos que constituían los liposomas en los que se llevaba a cabo la reconstitución, informando que cuando los ácidos grasos de los fosfolípidos eran saturados, la actividad era muy baja. De la misma manera se ha observado la influencia de la naturaleza del grupo polar en fosfolípido. Así, la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina activan la ACAT de hígado de cerdo; en cambio la fosfatidilserina o el fosfatidilinositol la inhiben. Sin embargo, la enzima proveniente de hígado de rata alcanzaba la máxima actividad cuando se reconstituía en liposomas formados por fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesterol.

Usando liposomas con distintas concentraciones de colesterol, se observó que cuando los niveles eran 3-4 veces superiores a los normales, se alcanzaba la máxima actividad enzimática, pero que concentraciones por encima de dichos valores, provocaban una caída en la actividad ACAT (258).

Estos experimentos inducen a pensar que la ACAT no es ajena a la composición lipídica de la membrana de la que forma parte, tanto desde el punto de vista de su fluidez (mayor o menor concentración de colesterol, fosfolípidos con ácidos grasos saturados o insaturados), como desde el punto de vista de la disponibilidad de sus sustratos (colesterol y acil-CoA graso).

En muchos aspectos, los estudios "in vitro"

han demostrado que la actividad ACAT intestinal es similar a la hepática. Así, análogas condiciones de ensayo son usadas, la actividad aparente puede ser estimulada por preincubación con liposomas ricos en colesterol o lipoproteínas ricas en colesterol libre (184,259).

Se ha observado que el incremento relativo de la actividad ACAT intestinal cuando se preincuba en liposomas ricos en colesterol puede verse modificado cuando los animales han sido sometidos a distintas dietas. En efecto, cuando se ensayó la actividad ACAT de mucosa intestinal de ratas alimentadas con una dieta control, se comprobó que la actividad ACAT se incrementaba 3 veces cuando los microsomas se preincubaron con liposomas ricos en colesterol, pero si las ratas se habían alimentado con una dieta suplementada con colesterol o colestiramina, los incrementos fueron de 2.2 y 4.2 veces respectivamente. Esto sugiere que un posible mecanismo de regulación de la enzima "in vivo" pueda ser la alteración de la disponibilidad de colesterol libre, como sustrato de la enzima (184).

La enzima hepática es muy sensible a los detergentes, pero de la intestinal hay poca información a este respecto, aunque se ha informado que, en contraste con la esterasa pancreática, la ACAT es inhibida por taurocolato, relacionando este efecto más con el poder detergente de este ácido biliar que con una interacción específica con la enzima (259).

Como en el hígado, la progesterona inhibe la actividad ACAT de los microsomas de la mucosa intestinal.

nal, observándose un efecto similar con etinil estradiol (260).

Recientes estudios de Field y Mathur (260) - han demostrado que la actividad ACAT de la mucosa intestinal fué incrementada por 25-hidroxicolesterol y - que este efecto estaba inversamente relacionado con el contenido microsomal de colesterol, sugiriendo que el hidroxiesterol mejoraba la disponibilidad del sustrato para la enzima.

Recientemente se han desarrollado una serie de compuestos que inhiben específica y drásticamente - la ACAT intestinal. Una de estas sustancias, el N-(1-oxo-9-octadecenil) DL triptófano (7) etil ester (o compuesto 57-118 de la casa Sandoz) además de inhibir la absorción de colesterol "in vivo", reduce drásticamente la actividad ACAT, aún a concentraciones micromolares y sin afectar a otras acil transferasas de la mucosa (261,262).

Se ha estudiado si el mecanismo de fosforilación-desfosforilación, como en el caso de la HMG-CoA reductasa, podría regular la actividad ACAT. En este sentido se ha descrito que la actividad de la enzima hepática puede ser estimulada por ATP 2 mM, en presencia de fluoruro sódico y que esta activación puede ser parcialmente suprimida por Cl_2Mg 2 mM, probablemente a través de la acción de una fosfatasa Mg^{++} dependiente (263).

Tanto en rata (264) como en hombre (265), se

ha apreciado un gradiente de actividad ACAT a lo largo del intestino delgado, comprobándose que los valores más elevados se encontraron en el yeyuno proximal y los más bajos en duodeno e íleon. Sin embargo, cuando la actividad enzimática se determinó en células de la mucosa aisladas, solo pudieron detectarse pequeñas diferencias. En conejo, la actividad específica más elevada de la ACAT se observó en la región media del intestino, por encima de los valores de duodeno e íleon(266).

Por otro lado, en el eje vertical de la mucosa de intestino de rata, la actividad ACAT se encontró predominantemente en las células de las vellosidades. En el yeyuno, la actividad ACAT de las vellosidades fué 2.7 veces más elevada que la de las criptas y en el íleon 1.3 veces (184).

la actividad de la ACAT intestinal, como ocurre con la enzima hepática, está sujeta a regulación por distintos efectores. Por ejemplo, existe la evidencia de que tanto en rata (184) cobaya (267) o conejo (266) una dieta suplementada con colesterol aumenta la actividad ACAT. En rata, el efecto es más aparente en yeyuno, sin embargo en conejo aparece mas o menos uniformemente distribuido en toda la longitud del intestino.

La administración de una dieta suplementada con colestiramina, reduce la absorción de colesterol y no afecta significativamente a la actividad ACAT del intestino de rata, aunque aumenta drásticamente la sín

tesis y el contenido de colesterol en el enterocito - (184).

En el conejo, la colestiramina desciende significativamente la actividad enzimática, a la vez que el contenido microsomal de colesterol (268).

Los resultados obtenidos tras la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, tanto en rata como en conejo, hacen pensar que el colesterol sintetizado "de novo" entra a formar parte de un "pool" que no se equilibra con el colesterol microsomal y que por lo tanto no constituye un sustrato preferente para la ACAT (184), contrariamente a lo informado en el hígado.

No obstante el papel de la ACAT en la esterificación del colesterol sintetizado por la mucosa in--testinal es un tema controvertido.

Se ha observado que la incorporación de mevalonolactona radiactiva a ésteres de colestrol aumentaba paralelamente con la concentración de lactona, sin embargo no se observó un incremento en la incoorpora--ción de ³H-ácido oleico. Esta paradoja se ha explicado, sugiriendo un rápido metabolismo de la mevalonolactona a ácidos grasos, que serían los encargados de esterifi-car al colesterol (269).

El efecto de una dieta grasa sobre la actividad de la ACAT en el intestino, depende tanto de la - cantidad como del tipo de grasa utilizada. Así, el áci

do oléico administrado a un medio en el que se mantiene en cultivo el intestino delgado, suprime la actividad ACAT (266). En cambio en ratas alimentadas durante tres días con una dieta con aceite de maiz al 10%, no se afecta prácticamente la actividad. Sin embargo, una dieta conteniendo el 20% de aceite de girasol estimula la actividad ACAT (184,270).

En rata, la máxima actividad de la ACAT intestinal, se ha observado al final del periodo de luz, notándose un incremento después de la ingesta y una disminución tras el ayuno (271). Estos cambios se han relacionado con el ligero incremento observado en el contenido en colesterol libre microsomal tras la ingesta de alimento.

PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con los antecedentes bibliológicos anteriormente expuestos, y con los trabajos desarrollados hasta ahora en nuestro Departamento, se redactó el siguiente Plan de Trabajo:

- 1.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el aislamiento de células epiteliales intestinales.
- 2.- Establecimiento de los criterios para la identificación de las distintas poblaciones celulares aisladas en duodeno, yeyuno e íleon.
- 3.- Determinación del contenido en colesterol, estudio de las actividades enzimáticas HMGR reductasa, PFMVA decarboxilasa, ACAT y la CoA hidrolasa, así como de la concentración de oleil-CoA y triglicéridos, en las células de las diferentes fracciones celulares aisladas a lo largo del intestino.
- 4.- Estudio del efecto de la suplementación de dieta con colesterol o colesterol saturado sobre distintas poblaciones celulares, así como del contenido de colesterol en las distintas fracciones celulares aisladas en duodeno, yeyuno e íleon.

PLAN DE TRABAJO

2.- PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos anteriormente expuestos, y con los trabajos desarrollados hasta ahora en nuestro Departamento, se planteó el siguiente Plan de Trabajo:

- 1.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el aislamiento de células epiteliales de intestino.
- 2.- Establecimiento de los criterios para la clasificación de las distintas poblaciones celulares aisladas en duodeno, yeyuno e íleon.
- 3.- Determinación del contenido en colesterol y estudio de las actividades enzimáticas HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa, ACAT y acil-CoA hidrolasa, así como de la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos y a fosfolípidos en las diferentes fracciones celulares aisladas a lo largo del intestino.
- 4.- Estudio del efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre las distintas actividades enzimáticas arriba mencionadas, así como del contenido de colesterol, en las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno, yeyuno e íleon.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.A. Material

3.A.1. Material Biológico

Se han utilizado pollos machos de la raza blanca (Gallus domesticus), que fueron suministrados día a día en su racimo por la empresa "Granja La Iba" de Alcalá de Henares (Madrid).

Para las experiencias descritas en el trabajo fueron realizadas con pollos de edades comprendidas entre 4 y 5 semanas.

3.A.2. Pistas y acondicionamiento de los animales

Los animales fueron mantenidos en el laboratorio departamental, en condiciones de libertad, con acceso y de acondicionamiento de los pollos, para que los que tuvieron libre acceso a agua y alimento.

Por ser una raza blanca, sencilla y sencilla natural, la reproducción de ellos no requiere gran cantidad de trabajo, y la crianza de los animales recientes, será realizada por el controlador de cría de pollos, para que los animales que se usen durante el experimento.

Los animales fueron alimentados con un tipo de alimento estándar, según el estándar A-60, para

MATERIAL Y METODOS

3.- MATERIAL Y METODOS

3.A. Material

3.A.1. Material biológico

Se han utilizado pollos machos de la raza Leghorn blanca (Gallus domesticus), que fueron suministrados el mismo día de su nacimiento por la empresa "Granja Los Arcángeles" de Alcalá de Henares (Madrid).

Todas las experiencias descritas en el presente - trabajo fueron realizadas con pollos de edades comprendidas entre 4 y 5 semanas.

3.A.2. Dietas y acondicionamiento de los animales

Los animales recién nacidos se instalaron en el - Departamento, en una habitación termostatzada entre 25-30°C y se acondicionaron de 15-20 individuos por jaula, de manera que tuvieran libre acceso al agua y alimentos.

Por ser una habitación cerrada y carente de luz - natural, la renovación de aire se mantuvo gracias a un ventilador de turbina, y la iluminación por medio de tubos fluorescentes, cuyo funcionamiento estaba controlado por temporizador electrónico, regulado de manera que el periodo luminoso durase de 9 a.m. a 9 p.m.

Los animales fueron alimentados "ad libitum" con - una dieta estandar, marca Sanders, tipo A-00, cuya composición

centesimal era la siguiente

Cereales.....	63
Subproductos vegetales.....	5
Tortas vegetales.....	22
Harinas animales.....	4
Alfalfa deshidratada.....	2
Corrector minero-vitamínico..	4

En determinados casos, la dieta fué suplementada con colesterol (Scharlau, fabricado por Ferosa) al 5%, ó colestiramina (Sigma) al 3%. Las dietas así preparadas fueron mezcladas hasta presentar un aspecto homogéneo y suministradas a los animales durante 5 días.

3.A.3. Aparatos e instrumentación

Las pesadas se realizaron en balanzas Sartorius - (p.max. 160 g, d=0.1 g) y Mettler H20T (p.max 160 g, d=0.01 mg).

Para la medida del pH se utilizaron pHmetros Radiometer pH M-84 ($\text{pH} \pm 0.01$) y Beckman modelo Zeromatic SS-3.

La homogeneización tisular se realizó en un sistema "Potter-Elvehjem" mecánico (MSE) provisto de un pistilo recubierto de teflón y tubo de vidrio.

La homogeneización celular se realizó con un aparato productor de ultrasonidos SonifierB-12 de Branson Sonic Power Company.

Para la agitación de tubos y viales se emplearon agitadores de la marca Heidolph.

Las incubaciones se realizaron en baños con termostatos portátiles Selecta. Para las incubaciones con agitación se emplearon incubadores metabólicos Gallenkamp IH-350.

Para el lavado de los discos Whatman DE-81 se utilizó un agitador Gallempkamp tipo Orbital Incubador.

Las lecturas colorimétricas para las determinaciones cuantitativas de proteínas y colesterol, se hicieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 35-Spectrophotometer, y las de las fosfatasas en un espectrofotómetro Pye Unicam Ultraviolet.

La toma de pequeños volúmenes se realizó con micropipetas "Emil Works" de enrase automático por estrangulamiento, y con micropipetas automáticas tipo Finnipette y tipo Pipetman (Gilson).

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrífuga de mesa Piccolo (Martin Christ), y en una centrífuga con refrigeración Beckman, modelo TJ-6.

Las centrifugaciones a mayor velocidad se realizaron en una centrífuga Beckman J2-21, y las ultracentrifugaciones en una ultracentrífuga preparativa Beckman modelo L3-50.

Para la centrifugación de pequeños volúmenes se utilizó una microfuga Beckman modelo B.

Para la medida de radiactividad se ha empleado un contador de centelleo líquido marca Beckman, modelo LS-7500.

Las placas de cromatografía se realizaron con un

extensor Shandan Unoplan, sobre placas de vidrio de -
20x5 cm.

Las preparaciones microscópicas se observa--
ron con un microscopio Zeiss modelo Standard-14.

Para desionizar el agua se utilizó un desio--
nizador Seta modelo R-600.

Los gases utilizados fueron suministrados por
Oximesa S.A.

El procesamiento de datos se realizó con una
calculadora programable Casio FX-770 P.

3.A.4. Reactivos

Todos los compuestos radiactivos usados fue--
ron suministrados por "The Radiochemical Centre" Amer--
sham (Inglaterra), a través de Nuclear Ibérica.

El resto de los productos utilizados (si no
se indica lo contrario) proceden de las casas Merck, -
Carlo Erba y Sigma.

3.B. Métodos

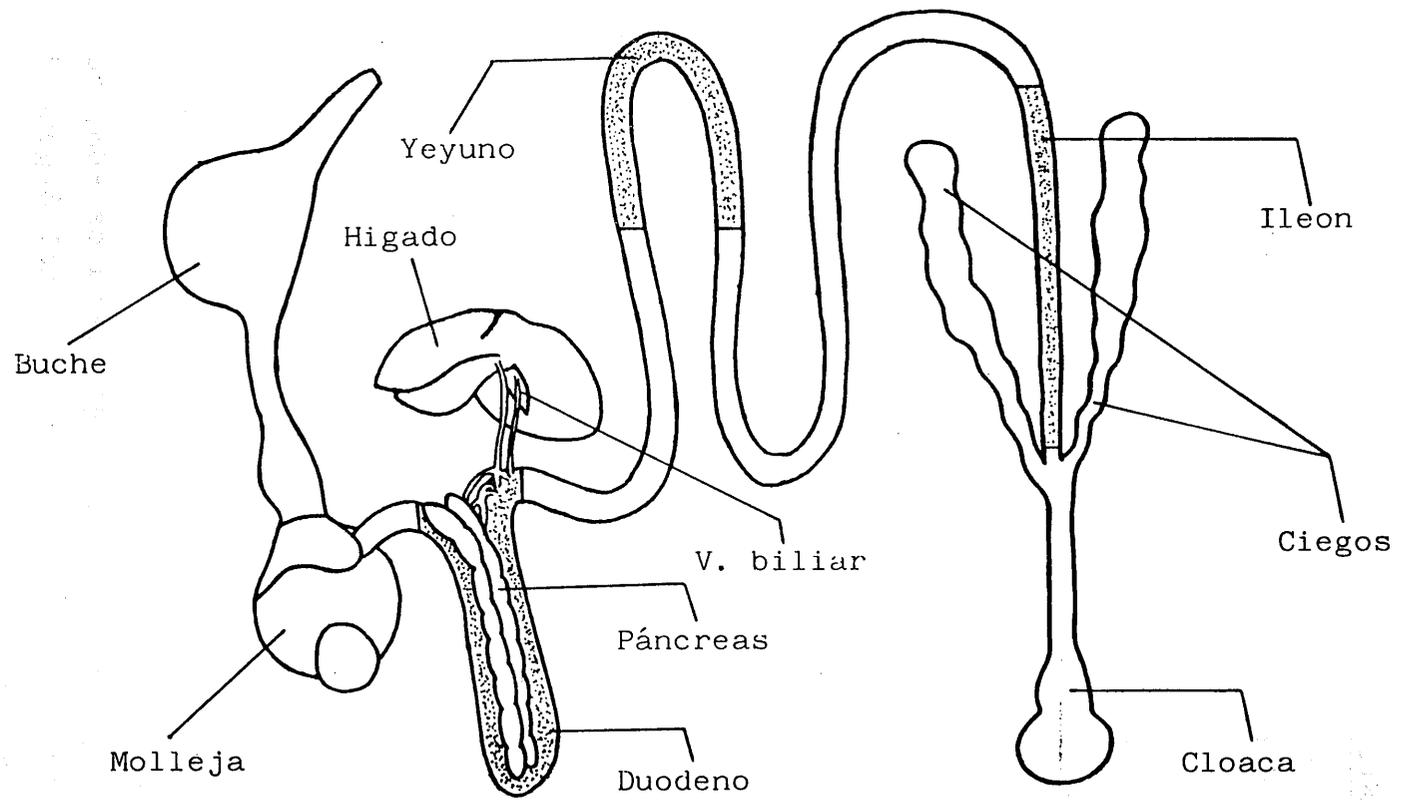
3.B.1. Aislamiento de enterocitos

Se siguió básicamente el método descrito por Weiser (240), con algunas modificaciones.

Los animales fueron sacados de las jaulas a las 9 h ó a las 15 h, y sacrificados por decapitación.- Una vez extraído el intestino, se procedió rápidamente a la separación de las tres regiones de estudio, distinguiéndolas de acuerdo con el siguiente criterio: - duodeno, región del intestino comprendida entre la molleja y la desembocadura del conducto biliar; yeyuno, - porción de 12 cm de intestino, medidos a partir de 15 cm de la desembocadura del conducto biliar; íleon, porción de 12 cm de intestino, medida hasta la desembocadura de los ciegos (Esquema nº 5).

Una vez separadas cada una de estas tres regiones, se introdujeron en PBS (phosphate buffered saline) pH 7.2 (ClNa 137mM, ClK 2.68mM, PO₄HNa₂ 8.16mM y PO₄H₂K 1.18mM), previamente gaseado con O₂ y conservado en un baño de hielo. A continuación se limpió el lumen intestinal inyectando PBS a presión con una jeringa, una vez limpio, cada fragmento se volvió del revés con una varilla de vidrio, de manera que la mucosa quedase hacia el exterior, atándolo en un extremo con un hilo de algodón y en el otro a una jeringa llena de PBS, con el objeto de poder controlar la turgencia del órgano durante el proceso de aislamiento.

Preparado de la manera antes indicada, se introdujo en un vaso de precipitado de plástico - -



Esquema 5.- Estructura general del aparato digestivo del pollo.

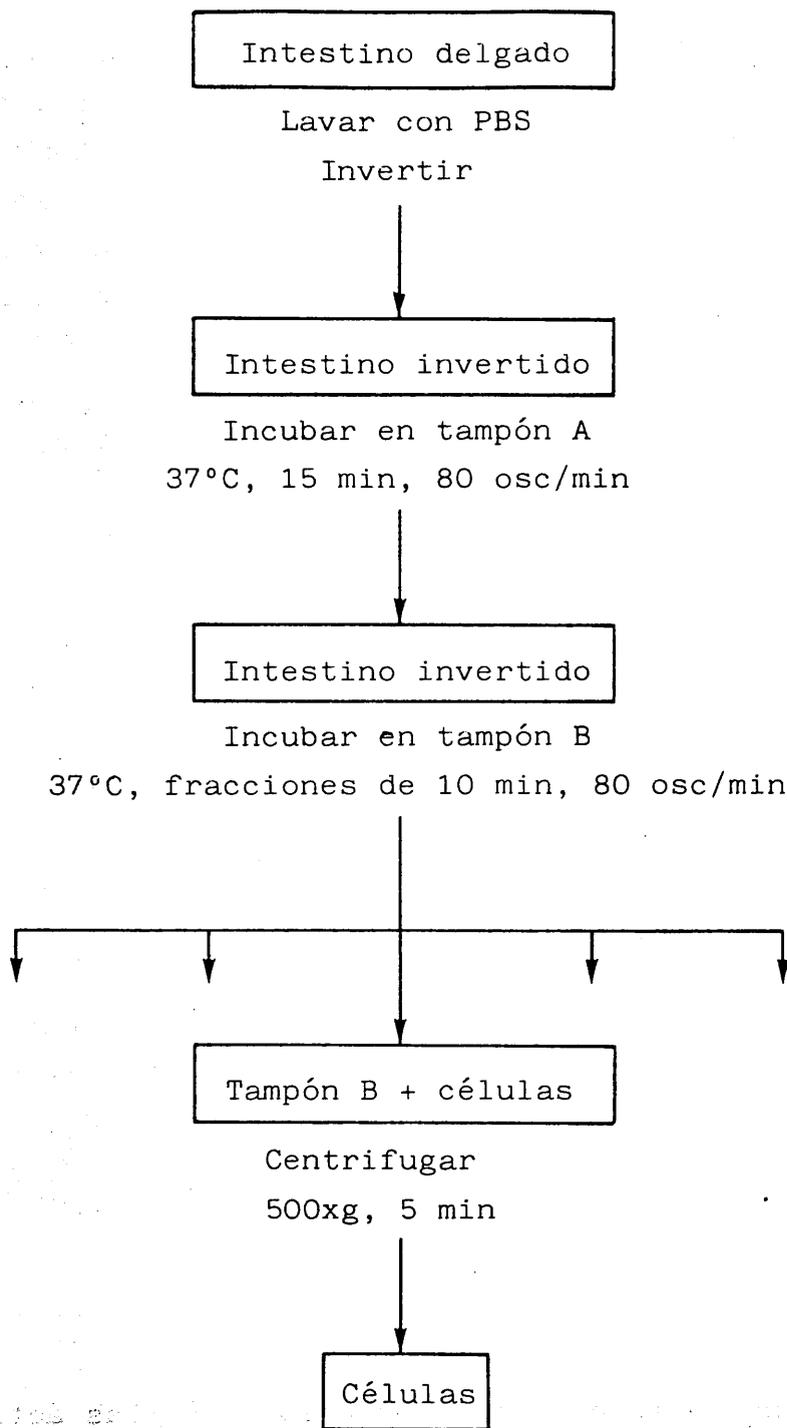
que contenía 20-25 ml de tampón A pH 7.3 (ClK 1.5 mM , ClNa 96 mM, citrato sódico 27 mM PO_4H_2K 8 mM, PO_4HNa_2 5.6 mM, glucosa 11.1 mM y DTT 1 mM), gaseado con O_2 y conservado en frío, incubándose durante 15 min a 37°C, con una agitación de 80 osc/min. Transcurrido este tiempo se retiró el tampón A, que se desecha, y se volvió a incubar en tampón B, gaseado con O_2 y conservado en frío, pH 7.2 (ClK 2.7 mM, ClNa 137 mM, PO_4H_2K 1.5 mM, PO_4HNa_2 4.3 mM, EDTA 1.5 mM, glucosa 11.1 mM y DTT 1 mM) a 37°C durante un periodo de tiempo variable, con una agitación de 80 osc/min.

Cada 10 min se recogieron los 15 ml de tampón B en los que se ha realizado la incubación, y que contienen las células epiteliales de la mucosa (enterocitos) que se han desprendido en ese periodo de tiempo. Las células así obtenidas se recogieron por centrifugación a baja velocidad (500xg, 5 min) y se resuspendieron, y conservaron en hielo, en tubos de plástico conteniendo PBS (Esquema nº6)

Las células así obtenidas se separaron en cuatro fracciones: células superiores de la vellosidad (VS), células medias de la vellosidad (VM), células inferiores de la vellosidad (VI) y células de las criptas (C).

El criterio adoptado para el reconocimiento y separación de cada una de estas poblaciones celulares, se hizo de acuerdo con los valores de las actividades enzimáticas de las distintas enzimas marcadoras empleadas (ver resultados).

La medida de la viabilidad celular se hizo mediante la prueba de integridad de las membranas celulares con azul tripán (azul tripán al 0.05% en PBS). Periódicamente se realizaron pruebas sobre distintas muestras, com



Esquema 6..- Proceso de aislamiento de enterocitos.

parando al microscopio las células teñidas con azul tripan (células muertas) con las que no se tiñeron (células vivas). Los porcentajes de células viables oscilaron entre el 90-95%.

3.B.2. Preparaciones enzimáticas

Las células obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito, se resuspendieron en volúmenes convenientes de los distintos tampones de homogenización de manera que la concentración final de proteínas oscilase alrededor de 10mg/ml.

El homogenado se obtuvo por sonicación en baño de hielo durante 20+20 segundos a una potencia de 100 wats. Excepcionalmente, como se indica en su caso, la homogenización se llevó a cabo con un potter mecánico con pistilo recubierto de teflón y vaso de vidrio.

El homogenado así obtenido fué la preparación sobre la que se hicieron las distintas determinaciones, excepto para las experiencias de subfraccionamiento celular en las que se sometió a sucesivas centrifugaciones (ver resultados).

3.B.3. Determinación del contenido proteico

La cuantificación del contenido proteico de las distintas preparaciones se realizó según el método de Lowry et al (241), basado en una asociación de las reacciones de Biuret y de Folin, la primera característica del enlace peptídico y de la función amina y la segunda de los grupos aromáticos de la tirosina y del triptófano. Como patrón se usó sero albúmina bovina.

3.B.4. Determinación de la actividad timidina kinasa

La técnica empleada ha sido básicamente la descrita por Klemperer y Haynes (242) y Breitman (247), salvo ligeras modificaciones, tal como se describe a continuación. La técnica está basada en la separación y determinación de los derivados fosforilados formados por la timidina kinasa a partir de la ^3H -timidina.

Antes de su sonicación las células se resuspendieron en un tampón de homogenización Tris-ClH 20mM pH 7.4 con Cl_2Mg 4mM.

3.B.4.1. Reacción enzimática

La reproducción "in vitro" de la reacción catalizada por la timidina kinasa se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 0.25 ml contenidos en tubos desechables de polietileno de 1 ml de capacidad:

- 0.125 ml de tampón Tris-ClH pH 8, 50mM.
- 0.025 ml de una solución 25mM de Cl_2Mg , en H_2O destilada.
- 0.025 ml de una solución 50mM de ATP en tampón Tris-ClH pH 8, 50mM.
- 0.025 ml de una solución de $6\text{-}^3\text{H}$ timidina en agua destilada conteniendo $25\mu\text{Ci}$ y 1.085 nmol.
- 0,050 ml de la preparación enzimática adecuadamente diluida con el tampón de homogenización, de manera que la concentración de proteínas es tuviese comprendida entre 5-10 mg/ml.

Como blanco de la reacción enzimática se han utilizado mezclas de incubación en las que la preparación enzimática fué sustituida por una solución de albumina -

bovina (5-10 mg/ml).

Previa preincubación durante 5 min a 37°C, la reacción se inició mediante la adición de 6-³H timidina, momento a partir del cual se dejó incubar la mezcla de reacción durante 60 min a 37°C.

La reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño con agua hirviendo durante 2 min y posteriormente en hielo. La proteína desnaturalizada se eliminó por centrifugación durante 5 min a 10.000xg.

3.B.4.2. Aislamiento y medida del producto de la reacción

Para la separación de la 6-³H timidina de sus derivados fosforilados, se procedió de la siguiente manera:

- 1º. Se pipetaron 0.025ml del sobrenadante sobre discos de papel impregnados de DEAE (Whatman DE-81)
- 2º. Inmediatamente después se introdujeron en matraces Erlenmeyer, conteniendo 20 ml por disco de formiato amónico 1 mM, y se agitaron suavemente (200-240 rpm) durante 15 min para eliminar de los discos la ³H-timidina no fosforilada.
- 3º. A continuación los discos se lavaron dos veces con formiato amónico 1 mM y una vez más con agua destilada.
- 4º. Tras el lavado, los discos se extrajeron del matraz y se secaron bajo una corriente de aire frío.
- 5º. Una vez secos, se introdujeron en viales de centelleo, a los que se les añadió 10 ml/vial del siguiente líquido de centelleo:

Tolueno	1000 ml
PPO.....	4 g
POPOP.....	0.05 g

Tras una agitación vigorosa de los viales, se procedió a la determinación de la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Cálculos

La actividad específica de la enzima, expresada como pmol de derivados fosforilados de la timidina formados por mg de proteína durante una hora, se calculó utilizando la siguiente fórmula

$$A.E = \frac{{}^3\text{H-c.p.m.} \times V_f}{R_e \times c \times V_e \times V_m \times E_f}$$

${}^3\text{H-c.p.m.}$: c.p.m. del tritio, contenido en la muestra y medidas por el contador de centelleo líquido.

Vf: Volumen final de la mezcla de reacción (ml).

Re: Radiactividad específica de ${}^3\text{H}$ -timidina usada como sustrato, expresada en d.p.m./pmol

c: Concentración en mg/ml de las proteínas contenidas en la preparación enzimática.

Ve: Volumen de preparación enzimática utilizada en la mezcla de reacción (ml).

Vm: Volumen de la alícuota tomada como muestra (ml).

Ef: Eficacia de conteo del contador de centelleo para la ${}^3\text{H}$ -timidina, expresado como d.p.m. - teóricas/c.p.m. medidas (0.05)

3.B.5. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

La técnica empleada ha sido básicamente la descrita por Weiser (240), con ligeras modificaciones, tal y como se describe a continuación.

Para su homogenización, las células se resuspendieron en tampón Tris-ClH pH 7.4, 50mM.

3.B.5.1. Reacción enzimática

La reacción catalizada por la fosfatasa alcalina se reprodujo "in vitro" con la mezcla de reacción que a continuación se detalla, contenida en un volumen final de 1.1 ml:

- 0.95 ml de tampón Tris-ClH pH 9.4, 0.5M
- 0.05 ml de una solución de Cl_2 Mg 220mM en agua destilada
- 0.05 ml de una solución de 4-nitrofenol - fosfato (PNP) 22 mM en tampón Tris-ClH pH 9.4 0.5 mM
- 0.05 ml de la preparación enzimática adecuadamente diluida de manera que la concentración final de proteínas oscilase entre 0.05 - 0.1 mg/ml.

Previa preincubación durante 5 min a 37°C, la reacción se inició en el momento de agregar los 0.05 ml de sustrato, a partir de lo cual se deja incubar la mezcla de reacción a 37°C durante 15 min, transcurridos los cuales la reacción se detiene por la adición de 0.5 ml de NaOH 0.5 N.

3.B.5.2. Determinación del producto de la reacción

El p-nitrofenol formado se determina espectrofotométricamente a 420 nm.

Para la realización de la curva patrón se tomaron cantidades de p-nitrofenol comprendidas entre -

0.01 y 0.1 μ mol disuelto en tampón Tris-ClH pH 9.4, 0.5M

Cálculos

La actividad específica de la enzima, expresada como μ mol de p-nitrofenol formado por mg de proteína durante 15 minutos, se calculó mediante la siguiente expresión

$$A.E. = \frac{D.O. \times a \times d}{C \times V_e}$$

D.O.: densidad óptica medida a 420 nm

a: pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por el método de mínimos cuadrados en μ mol/U.D.O.

d: dilución que se ha hecho a partir del extracto original

c: concentración de proteínas, en mg/ml, de la preparación enzimática.

Ve: volumen de la preparación enzimática utilizada en el ensayo, expresado en ml

3.B.6. Determinación de la actividad fosfatasa ácida

La técnica empleada ha sido, básicamente, la descrita por Bingham y Zittle (243), con algunas modificaciones.

Para su homogeneización, las células se resuspendieron en tampón Tris-ClH pH 7.4 50 mM.

3.B.6.1. Reacción enzimática

La reacción catalizada por la fosfatasa ácida se reprodujo "in vitro" con la mezcla de reacción - que a continuación se detalla, contenida en un volumen final de 1.1 ml.

- 0.95 ml de tampón citrato pH 5.2, 0.1 M
- 0.05 ml de una solución 220 mM de Cl_2Mg en agua - destilada
- 0.05 ml de una solución 22 mM de 4-nitroformol fosfato (PNP) en tampón citrato pH 5.2, 0.1M
- 0.05 ml de la preparación enzimática, adecuadamente diluida de manera que la concentración final de proteínas oscilase entre 1-3 mg/ml.

La reacción se inició añadiendo los 0.05 ml de PNP a la mezcla de reacción, tras haber preincubado 5 min a 37°C los componentes de la misma, dejando a continuación incubar la mezcla 30 min a 37°C, transcurridos los cuales la reacción se detuvo por la adición de 0.5 ml de NaOH 0.5 N.

3.B.6.2. Determinación del producto de la reacción

El p-nitrofenol formado se determina espectrofotométricamente a 420 nm.

Para la realización de la curva patrón se tomaron cantidades comprendidas entre 0.01 y 0.1 μmol de p-nitrofenol, disuelto en tampón citrato 0.1 M, pH 5.2

Cálculos

La actividad específica de la fosfatasa ácida

da, expresada como μmol de p-nitrofenol formado por mi ligramo de proteina en 30 min, se calculó mediante la siguiente expresión

$$\text{A.E.} = \frac{\text{D.O.} \times a \times d}{c \times \text{Ve}}$$

D.O.: densidad óptica medida a 420 nm

a: pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por el método de minimos cuadrados en $\mu\text{mol/U.D.O.}$

d: dilución que se ha hecho a partir del extracto original.

c: concentración de proteínas en mg/ml de la preparación enzimática.

Ve: Volumen de la preparación enzimática, usada en el ensayo, expresado en ml.

3.B.7. Determinación de la actividad PPMVA descarboxilasa

Se ha utilizado el método descrito por Slakey et al (244), modificado por González-Pacanowska et al - (251), tal como se describe a continuación.

La técnica utilizada está basada en la extracción de los alcoholes formados durante la reacción enzimática, después de tratar la mezcla de incubación con fosfatasa alcalina.

Para su homogeneización, las células se re-suspendieron en el siguiente tampón: tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.4 que además contiene EDTA 30 mM, -

ClNa 250 mM y DTT 1mM. Dado que el EDTA basifica considerablemente el medio, para la realización del tampón se disolvió previamente el ClNa, EDTA y DTT en un volumen a decuado de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 50 mM hasta conseguir un pH de 7.4 y posteriormente se completó hasta el volumen deseado con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.4.

3.B.7.1. Reacción enzimática

La mezcla de reacción contenida en un volumen final de 1 ml, fué en todos los casos la siguiente:

- 0.725 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 5.7
- 0.050 ml de una solución 110 mM de Cl_2Mg en H_2O destilada.
- 0.150 ml de una solución 23.33 mM de ATP en tampón fosfato potásico pH 5.7, 0.1 M
- 0.025 ml de R-2- ^{14}C PPMVA (5 nmol, 588.3×10^3 d.p.m.) en una disolución de NH_4OH 10mM
- 0.050 ml de la preparación enzimática adecuadamente diluida con el tampón de homogenización, de manera que su concentración en proteínas fuese alrededor de 2.5 mg/ml.

La reacción se llevó a cabo en tubos de centrífuga con tapones de rosca. El procedimiento seguido fué el siguiente:

- 1º. La reacción se comenzó añadiendo los 0.025 ml de R-2- ^{14}C PPMVA a la mezcla de reacción, tras haber preincubado 5 min a 37°C los componentes de la misma. Los tubos se cerraron y tras una agitación suave se dejaron incubar a 37°C 15 min.
- 2º. Transcurrido el tiempo previsto, la reacción

se detuvo sumergiendo los tubos en agua hirviendo durante 3 min. A continuación se colocaron de nuevo en un baño a 37°C durante 5 min.

- 3°. Pasado este tiempo, a cada tubo se le añadieron 7 mg(9.8 U) de fosfatasa alcalina bovina tipo I, disuelta en 0.5 ml de tampón - Tris-ClH 1 M pH 8.8. Tras una agitación suave se dejaron incubar los tubos durante 150 min para asegurar la obtención de alcoholes libres a partir de sus derivados fosforilados, obtenidos como productos de la reacción.

3.B.7.2. Detección y medida de los productos de la reacción.

La extracción y determinación de los alcoholes formados se ha llevado a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se adicionaron a la mezcla de reacción, después de haber actuado las fosfatasas, 2 ml de éter etílico, agitando a continuación vigorosamente el tubo durante 30 seg. Posteriormente se dejó en reposo hasta que se separaron dos fases, una superior orgánica y otra inferior acuosa. Con la ayuda de una pipeta Pasteur la fase orgánica fué llevada a otro tubo. Esta operación se repitió otras dos veces y las fases orgánicas así obtenidas se combinaron y agitaron suavemente, procediéndose a continuación a la toma de una alícuota (1 ml) para su medida en el contador de centelleo líquido

El líquido de centelleo utilizado (10 ml/vial)

fué el siguiente

Tolueno.....	1000 ml
Etanol.....	100 ml
PPO.....	4 g
POPOP.....	0.125 g

Cálculos

La actividad específica de la PPMVA descarboxilasa se expresó como pmol de alcoholes liberados por miligramo de proteína en un minuto, realizándose los cálculos según la expresión

$$A.E. = \frac{c.p.m.muestra \times V_f}{c \times V_e \times V_m \times R_e \times E_f \times t}$$

c.p.m. muestra: c.p.m. obtenidas al medir en el contador de centelleo la alícuota tomada de las fases orgánicas combinadas

V_f: volumen final de las fases orgánicas combinadas (6 ml)

c: concentración proteica de la preparación enzimática utilizada, expresada en mg/ml.

V_e: volumen de la preparación enzimática utilizada en la mezcla de reacción, expresado en ml.

V_m: volumen de la alícuota de las fases orgánicas combinadas, expresado en ml.

R_e: radiactividad específica del 2-C¹⁴ PPMVA utilizado en la mezcla de reacción, expresada en d.p.m./ pmol.

E_f: Eficiencia de contaje del contador de centelleo líquido para el sustrato radiactivo empleado, expresado como d.p.m. teórica/c.p.m. medidas (0.96).

t: tiempo de incubación, en min.

3.B.8. Determinación de la actividad HMG CoA reductasa

Para la determinación "in vitro" de la actividad HMG-CoA reductasa se ha seguido básicamente el método descrito por Shapiro et al : (245), modificado por Alejandre et al (246), tal como se describe a continuación.

La técnica está basada en la incorporación de radiactividad del sustrato marcado con ^{14}C ($3\text{-}^{14}\text{C}$ - HMG-CoA) a mevalonato, producto de la reacción. Puesto que se requiere un aporte considerable de coenzima reducido (2 moléculas de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ por molécula de sustrato transformada), frecuentemente se recurre a un sistema enzimático acoplado que regenera a un ritmo adecuado los equivalentes de reducción gastados. En la técnica utilizada, este sistema regenerante está integrado por glucosa-6-P, glucosa 6-P-deshidrogenasa y NADP^+ .

Una vez transcurrida la reacción, las mezclas son acidificadas con un doble objetivo: inactivar la reductasa y convertir el ácido mevalónico en su δ -lactona, de polaridad sensiblemente menor a la del sustrato y sus hidrolizados, de los que puede ser separada por cromatografía.

La inclusión de un estandar interno de ^3H -mevalonato permite la corrección por pérdidas, durante el proceso de aislamiento del producto.

Para su sonicación, las células se resuspendieron en el tampón de homogenización descrito en 3.B.7.

3.B.8.1. Reacción enzimática

La reproducción "in vitro" de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final 0.175 ml, contenidos en tubos desechables de polietileno, provistos de tapón, de 1 ml de capacidad.

- 0.1 ml de la preparación enzimática adecuadamente diluida con el tampón de homogenización de manera que su concentración en proteínas - fuese alrededor de 2.5 mg/ml.
- 0.025 ml de una mezcla (Sistema regenerante) - que en este volumen contenía 4.5 μ moles de G6P, 0.3 U.I. de G6P-DH y 450 nmol de NADP⁺ disueltos en el tampón de homogenización (tampón con protectores). La mezcla se preparaba extemporáneamente.
- 0.050 ml de una disolución de HMG-CoA y $3\text{-}^{14}\text{C}$ HMG-CoA en tampón fosfato potásico pH 5.8, 50 mM, de una concentración tal que en ese volumen hubiese 100 nmol de sustrato, de radiactividad específica 2000 d.p.m./nmol.

El procedimiento seguido fué el siguiente:

- 1.- Los 0.1 ml de extracto se introdujeron en los tubos de reacción y se preincubaron a 37°C durante 5 min.
- 2.- La reacción se inició por la adición del sustrato - marcado y del sistema regenerante por este orden. Una vez cerrados los tubos, se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 30 min.
- 3.- Transcurrido este tiempo la reacción se detuvo añadiendo 0.025 ml de ClH 10N.
- 4.- Así mismo, al terminar la reacción, se añadieron -

0.025 ml de una solución tamponada de mevalonolactona y ^3H -mevalonolactona, tal que en el volumen citado contengan 0.78 mg, y entre 25.000 - 30.000 d.p.m. de lactona, que constituye el estandar interno mediante el que pueden cuantificarse las pérdidas acumuladas durante la manipulación posterior. Por otra parte, actuará de portador facilitando el desarrollo en capa fina de las pequeñas cantidades de ^{14}C -mevalonolactona procedentes de la reacción enzimática.

- 5.- Una vez detenida la reacción, la mezcla (cuyo volumen era de 0.225 ml) se mantuvo otros 30 min a 37°C para facilitar la completa lactonización del mevalonato formado enzimáticamente.
- 6.- Por último, los tubos se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 1 min en una microfuga, con el fin de sedimentar las proteínas, y posteriormente se conservaron refrigerados hasta el momento de la cromatografía en capa fina.

3.B.8.2. Aislamiento y medida del producto de reacción

La mevalonolactona puede ser fácilmente separada del HMG-CoA y de sus productos de hidrólisis mediante cromatografía en capa fina. Para ello, se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Sobre un extensor Shandan Unoplan se colocaron placas de vidrio de 5 x 20 cm y se desengrasaron con acetona.

Por otra parte, 50 g de silicagel G (tipo-60 Merck) se llevaron a 100 ml con agua destilada. La suspensión se agitó vigorosamente durante 1.5 min y a continuación se vertió sobre el dispositivo distribuidor (colocado para un espesor de capa de 0.75 mm) y se extendió uniformemente sobre las placas.

Las placas se dejaron secar completamente al aire y posteriormente se activaron a 110°C al menos durante 60 min. Una vez activadas de esta forma, - se guardaron en campanas de desecación hasta el momento de utilizarlas.

- 2.- Sobre las placas activadas, y a unos 2 cm del borde, se aplicaron 0.100 ml de cada uno de los sobrenadantes, procediendo primero con 0.050 ml, y tras dejar secar a temperatura ambiente, con los restantes a 0.050 ml.

Una vez asegurado que los 0.100 ml de muestras depositados en el origen de la placa estaban - secos, se procedió a su desarrollo en un sistema - benceno: acetona (1:1). Previamente las campanas - rodeadas interiormente con papel de filtro, se habían mantenido cerradas al menos durante 60 min, para conseguir una saturación completa.

- 3.- Puesto que la zona de la placa que contiene la mevalonolactona se encuentra comprendida entre los - valores 0.38 y 0.70 de Rf, se procedió a rasparla y a depositarla en los viales de centelleo.

- 4.- Sobre ellos se añadieron 10 ml/vial del siguiente líquido de centelleo

Dioxano.....	1000 ml
Naftaleno.....	100 g
PPO.....	7 g
dimetil POPOP.....	0.3 g

agitando a continuación vigorosamente durante 15 seg.

- 5.- Además del conjunto de viales problema, en cada experiencia se introdujo un vial más, conteniendo - 0.025 ml del ³H-mevalonolactona que constituía el patrón de tritio.

Cálculos

La actividad específica de la HMG-CoA reduc tasa se expresa como pmol de mevalonolactona formados por mg de proteína en un min, realizandose los cálculos según la formula

$$A.E. = \frac{\text{d.p.m. } ^3\text{H-p} \times \text{d.p.m. } ^{14}\text{C-m}}{\text{d.p.m. } ^3\text{H-m} \times \text{Re} \times \text{c} \times \text{Ve} \times \text{t}}$$

d.p.m. $^3\text{H-p}$: d.p.m. de ^3H contenido en el patrón.

d.p.m. $^{14}\text{C-m}$: d.p.m. del ^{14}C contenido en la muestra.

d.p.m. $^3\text{H-m}$: d.p.m. del ^3H contenido en la muestra.

Re: radiactividad específica del $^3\text{-}^{14}\text{C}$ -HMG-CoA en d.p.m./pmol.

c: concentración en proteínas de la preparación enzimática utilizada, expresada en mg/ml.

Ve: volumen de la preparación enzimática utilizado en la mezcla de reacción (ml).

t: tiempo de incubación, en min.

3.B.9. Determinación de la actividad ACAT

Para la determinación "in vitro" de la actividad ACAT se ha seguido básicamente el método descrito por Goodman et al (248), modificado por Marco et al (249), tal como se describe a continuación.

Dicho método está basado, como la mayoría de los actuales, en la utilización como sustrato exógeno el acil-CoA graso radiactivo, y como sustrato endógeno el colesterol celular, de tal forma que el producto de la reacción, el colesterol esterificado por el grupo acilo, sería radiactivo y por tanto podría ser medido.

Para el aislamiento del colesterol esterificado es necesario en primer lugar, hacer una extracción lipídica (según el procedimiento de Folch et al - (250)), y posteriormente una separación por cromatografía en capa fina de los distintos componentes de dicha fracción lipídica.

Para su sonicación, las células se resuspendieron en el mismo tampón de homogeneización descrito en 3.B.7.

3.B.9.1. Reacción enzimática

La reproducción "in vitro" de la reacción catalizada por la ACAT se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 0.2 ml, contenidos en un tubo de reacción provisto de tapón de rosca:

- 0.100 ml de la preparación enzimática adecuadamente diluida con el tampón de homogeneización, de manera que la concentración final de proteínas fuese 2-3 mg/ml.
- 0.025 ml de DTT (2 mmol) en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.4.
- 0.050 ml de albúmina bovina exenta de ácidos grasos (1.2 mg) disuelta en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.4.
- 0.025 ml de una solución de oleil-CoA y $1-^{14}\text{C}$ - oleil-CoA, de tal concentración que en ese volumen hubiera 10 nmol de sustrato de una radiactividad específica de 20.000 d.p.m./nmol.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- 1.- La mezcla de reacción sin el sustrato radiactivo se preincuba durante 5 min a 37°C.
- 2.- Transcurrido este tiempo, la reacción se inició por la adición de 1-¹⁴C-oleil-CoA, dejándose incubar durante 2 min a 37°C.
- 3.- Después de esta incubación, la reacción se detuvo - por la adición, y posterior agitación, de 4 ml de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v) que contiene en disolución colesteril oleato (5 mg/100 ml) y que actuará como portador en la cromatografía en capa fina que se ha de efectuar posteriormente.

3.B.9.2. Aislamiento y medida del producto de la reacción

- 1.- Una vez detenida la reacción se agregaron 0.1 ml de ³H-colesteril-oleato (20.000 d.p.m.), que actuará como estándar interno, y 1 ml de agua acidulada con ácido sulfúrico (2.000:1, v/v) que servirá para lograr una perfecta separación entre la fase acuosa y la clorofórmica.
- 2.- Tras una agitación vigorosa para efectuar la extracción de los lípidos, se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min a 4°C para lograr la adecuada separación entre las fases acuosa y clorofórmica.
- 3.- A continuación se recogió la fase clorofórmica, que se llevó a otro tubo de centrifuga con tapón de roca, en el que se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

La muestra así obtenida se puede guardar en frío hasta su posterior utilización.

- 4.- El extracto lipídico resultante de la extracción anterior se redisolvió en 0.2 ml de cloroformo y se mantuvo en un baño de hielo.

- 5.- De él se tomaron 0.1 ml, que se depositaron a 2 cm del borde de una placa de cromatografía previamente activada, de 5 x 20 cm con un espesor de capa de 0.5 mm.
- 6.- A continuación la placa se desarrolló en una campana de cromatografía, que se había dejado saturar - al menos durante 60 min, con un líquido de desarrollo formado por exano, eter etílico y ácido acético (70:30:1, v/v/v).
- 7.- Una vez alcanzado el frente los 16-17 cm, se retiraron las placas y se dejaron secar al aire en una campana de gases.
- 8.- Para identificar los productos separados por la cromatografía, se procedió al revelado de la placa, - por vapores de iodo. El iodo sublimado se fija a - los dobles enlaces apareciendo manchas de color amarillento en las distintas zonas donde existen sustancias con estos dobles enlaces, se señalaron con la ayuda de un punzón y se eliminó a continuación el iodo, dejando las placas al aire hasta la desaparición del color.

La identificación de cada uno de los productos separados se hizo según sus Rf característicos:

Colesterol esterificado.....	0.81
Metil oleato.....	0.63
Triglicéridos.....	0.52
Acidos grasos.....	0.32
Colesterol libre.....	0.19
Fosfolípidos.....	0.00

- 9.- Para la medida de las muestras por espectroscopía de centelleo líquido, se raspó la mancha correspondiente al colesterol esterificado, y se depositó -

en viales de centelleo, a los que se le agregaron 10 ml/vial del siguiente líquido de centelleo:

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

9.- Por último los viales se agitaron vigorosamente durante 15 seg.

En cada experiencia se introdujo un vial más conteniendo 0.100 ml de ³H-colesterol esterificado, que constituía el patrón de tritio.

Cálculos

La actividad específica de la ACAT se expresó en pmol/mg proteína por min de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$A.E. = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C-m} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H-p}}{\text{d.p.m. } ^3\text{H-m} \times \text{Re} \times \text{t} \times \text{c} \times \text{Ve}}$$

d.p.m. ¹⁴C-m: d.p.m. del ¹⁴C contenido en la muestra.

d.p.m. ³Hp: d.p.m. del ³H contenido en el patrón de ³H-colesterol-oleato.

d.p.m. ³H-m: d.p.m. del ³H contenido en la muestra.

Re: radiactividad específica del sustrato, expresada en d.p.m./pmol.

t: tiempo de incubación en min

c: concentración de proteínas de la preparación enzimática, expresada en mg/ml.

Ve: volumen de preparación enzimática usada en el ensayo, expresado en ml.

3.B.10. Determinación de la actividad acil-CoA hidrolasa

Se siguió básicamente el método descrito por Marco et al (249), con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación.

En la reacción de la ACAT, en la que interviene un acil-CoA graso como sustrato, puede tener importancia la hidrólisis de éste, a acil graso y CoA libre por acción de la acil-CoA hidrolasa, lo que acarrearía, si la hidrólisis es elevada, una falta de disponibilidad de sustrato para dicha enzima.

El ensayo de la actividad acil-CoA hidrolasa se realizó bajo las mismas condiciones que el de la ACAT.

La medida de la actividad se llevó a cabo - raspando en la placa de cromatografía la zona correspondiente a ácidos grasos, y midiendo la radiactividad en un contador de centelleo líquido de la misma manera indicada para la ACAT.

Cálculos

La actividad específica de la acil-CoA hidrolasa se expresó en nmol/mg de proteína x min de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$A.E. = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C-m} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H-p}}{\text{d.p.m. } ^3\text{H-m} \times \text{Re} \times \text{t} \times \text{c} \times \text{Ve}}$$

d.p.m. $^{14}\text{C-m}$: d.p.m. del ^{14}C contenido en la muestra

d.p.m. $^3\text{H-p}$: d.p.m. del ^3H patrón

d.p.m. ^3H -m: d.p.m. del ^3H contenido en la muestra
 Re: radiactividad específica del sustrato expresada en
 d.p.m./nmol.
 t: tiempo de incubación en min.
 c: concentración en proteínas de la preparación enzimá-
 tica expresada en mg/ml.
 Ve: volumen de la preparación enzimática usada en la -
 reacción, expresado en ml.

3.B.11. Determinación de la incorporación oleil-CoA a triglicéridos

Se siguió básicamente el método descrito por Marco et al (273)

En los triglicéridos, el ácido oléico es uno de los ácidos grasos que entra a formar parte de su mo l é c u l a. La técnica utilizada se ha basado en la medida de la radiactividad de los triglicéridos formados a par tir de ^{14}C -oleil-CoA como sustrato

Tanto en el ensayo de la actividad formadora de triglicéridos, como en la determinación de éstos, se ha empleado la técnica descrita en 3.B.9., con la única diferencia, que para su aislamiento se raspó la pla ca de cromatografía a la altura correspondiente a un $R_f=0.52$.

Cálculos

La incorporación de oleil-CoA a trigliceridos, expresada en nmol/mg proteína x minuto, se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$I = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C-m} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H-p}}{\text{d.p.m. } ^3\text{H-m} \times \text{Re} \times \text{t} \times \text{c} \times \text{Ve}}$$

d.p.m. ^{14}C -m: d.p.m. del ^{14}C contenido en la muestra.
d.p.m. ^3H -p. d.p.m. del ^3H patrón.
d.p.m. ^3H -m: d.p.m. del ^3H contenido en la muestra.
Re: Radiactividad específica del sustrato, expresada -
en d.p.m./nmol.
t: tiempo de incubación, en min.
c: concentración de proteínas de la preparación enzi--
mática, expresada en mg/ml
Ve: volumen de la preparación enzimática usado en la -
reacción, expresado en ml.

3.B.12. Determinación de la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos

Se siguió básicamente el método descrito por Marco et al (273).

El ácido oléico es uno de los constituyentes de los distintos fosfolípidos presentes en la mucosa - intestinal. La técnica utilizada se ha basado en la medida de la radiactividad de los fosfolípidos formados a partir del ^{14}C -oleil-CoA como sustrato.

Tanto en el ensayo de la actividad formadora de fosfolípidos, como en la determinación de éstos, se ha empleado la técnica descrita en 3.B.9, con la única diferencia, que para su aislamiento se raspó la placa de cromatografía a la altura correspondiente a un $R_f=0$

Cálculos

La incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en nmol/mg proteína x minuto, se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C-m} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H-p}}{\text{d.p.m. } ^3\text{H-m} \times \text{Re} \times \text{t} \times \text{c} \times \text{Ve}}$$

d.p.m. ^{14}C -m: d.p.m. del ^{14}C contenido en la muestra.
d.p.m. ^3H -p: d.p.m. del ^3H patrón.
d.p.m. ^3H -m: d.p.m. del ^3H contenido en la muestra.
Re: radiactividad específica del sustrato, expresada en
d.p.m./nmol
t: tiempo de incubación, en min.
c: concentración en proteínas de la preparación enzimática, expresada en mg/ml.
Ve: volumen de la preparación enzimática usado en la -
reacción, expresado en ml.

3.B.13. Determinación de colesterol total y libre

Para la determinación de colesterol total y libre, se realizó previamente una extracción lipídica - según el método de Folch et al (250), con algunas modificaciones, y posteriormente la determinación se llevó a cabo sobre ese extracto lipídico mediante un "test" - comercial de la casa Boehringer.

El procedimiento seguido fué el que se describe a continuación.

3.B.13.1 Extracción lipídica

- Del homogenado celular, se tomaron 0.4 ml, que -
contenían entre 4-6 mg de proteína, a los que se
le añadieron 8 ml de una mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v)
- Se agitó vigorosamente al menos durante un min, -
con el objeto de asegurar una buena extracción.
- Se agregó un ml de agua acidulada (agua-sulfúrico,
2.000:1, v/v) y se volvió a agitar.
- Se centrifugó a 4000 x g durante 10 min a 4°C, con
el objeto de separar las fases acuosa y orgánica.

- Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se tomó la fase orgánica y se trasladó a otro tubo con tapón de rosca, en el que se llevó a sequedad en corriente de N_2 .
- El extracto lipídico así obtenido se redisolvió en 0.7 ml de cloroformo y tras agitar se tomaron distintas alícuotas sobre otros tantos tubos de ensayo (0.1 y 0.2 ml) para determinar colesterol total, y otros tantos (0.1 y 0.2 ml) para determinar el colesterol libre.
- Cada una de estas alícuotas fué llevada de nuevo a sequedad en corriente de N_2 , y el extracto lipídico resultante se redisolvió en 0.025 ml de isopropanol.

3.B.13.2. Determinación de colesterol total.

Se realizó según un "test" comercial de la casa Boehringer.

Está basado en un método enzimático, por el que gracias a la acción combinada de una colesteroles-terasa (que hidroliza los ésteres de colesterol), de una colesteroles-oxidasa (que oxida el colesterol a colestano con desprendimiento de agua oxigenada), y de una peroxidasa que oxida a unos compuestos para rendir una sustancia coloreada que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 500 nm.

El procedimiento seguido fué el que se describe a continuación, de acuerdo con el protocolo dado por la casa comercial:

- Se tomó un volumen V de reactivo 1 (tampón fosta

to potásico 0.4 M, pH 7.7, fenol 20 mM, y fenol 1.85 M) y se mezcló con otro volumen V igual del reactivo 2 (tampónfosfato potásico 0.4 M, pH 7.7, 4-aminofenazona 2 mM, metanol 1.85 M, hidroxipolietoxidecano al 0.4%)

- A la solución anteriormente preparada se le agregó un volumen V/100 de un reactivo 3 (colesteroles-terasa 40 U/ml, colesterol-oxidasa 12 U/ml y peroxidasa 8 U/ml) para obtener un reactivo 4.
- De este reactivo 4 se tomaron 2 ml y se le agregaron a cada una de las muestra lipídicas anteriormente obtenidas y disueltas en 0.025 ml de isopropanol.
- tras una agitación suave se incubaron durante 15 min a 37°C.
- Pasado este tiempo, se leyeron en un espectrofotómetro a 500 nm, frente a un blanco que solo contenía 0.025 ml de isopropanol.

Para la realización de la curva patrón se tomaron cantidades comprendidas entre 5-50 µg de colesterol.

Cálculos

La cantidad de colesterol total, expresada como µg de colesterol/mg de proteína, se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g col/mg prot.} = \frac{\text{D.O.} \times V_r \times a}{V_a \times V_m \times c}$$

D.O.: D.O. medida a 500 nm

Vr: volumen en el que se resuspende la muestra tras la extracción, expresado en ml.

- a: pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por el método de mínimos cuadrados, en $\mu\text{g}/\text{U.D.O.}$.
- Va: volumen de la alícuota de Vr tomado para hacer la determinación, expresado en ml.
- Vm: volumen de la muestra de homogenado al que se le hace la extracción, expresado en ml.
- c: concentración de proteínas del homogenado, expresado en mg/ml.

3.B.13.3. Determinación de colesterol libre

Se realizó según un "test" comercial de la casa Boehringer.

Está basado en el mismo método enzimático descrito para el caso de la determinación de colesterol total, con la única diferencia de que en este "test" no existe colesteroesterasa, por lo que sólo se mide el colesterol libre presente en la muestra.

El procedimiento seguido fué el mismo descrito en 3.B.13.2.

Cálculos

La cantidad de colesterol libre, expresada en μg de colesterol/mg de proteína, se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mu\text{g colesterol libre/mg prot.} = \frac{\text{D.O.} \times \text{Vr} \times \text{a}}{\text{Va} \times \text{Vm} \times \text{c}}$$

D.O. : D.O. medida a 500 nm

Vr: volumen en el que se resuspende la muestra tras la extracción, expresado en ml.
a: pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por el método de mínimos cuadrados, expresado en ug/U.D.O.
Va: volumen de la alícuota tomado de Vr para hacer la determinación, expresado en ml.
Vm: volumen de la muestra de homogenado del que se hace la extracción, expresado en ml.
c: concentración de proteínas del homogenado, expresado en mg/ml.

3.B.14. Tratamiento de datos

Los datos experimentales se expresan generalmente como la media de los valores obtenidos de distintos animales \pm el error estandar de la media.

El ajuste de rectas de regresión se realizó por el procedimiento convencional, según el método de mínimos cuadrados.

Para comparar distintos valores entre sí, se verificó en primer lugar si las varianzas muestrales de ambos grupos se podían considerar iguales o diferentes, a un nivel de significación del 0.05, mediante el "test" de significación de diferencias entre dos varianzas de Snedecor. Según el caso, se aplicó el "test" correspondiente de la "t" de Student, calculándose mediante un programa de ordenador el valor de la probabilidad (p) de que ambas muestras pertenezcan a la misma población.

En la preparación de tablas y figuras, así como en la nomenclatura de compuestos y en la utilización de unidades, hemos seguido normalmente las reco-

mendaciones de diversos organismos científicos internacionales, recopilados en "Instructions to authors" - (1985) J. Biol. Chem. (272).

RESULTADOS

El presente informe tiene por objeto exponer los resultados de las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951. Los datos que se presentan en este informe corresponden a las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951.

Las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949. Las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949.

Las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949. Las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949.

ESTADÍSTICA DE LA INDUSTRIA Y COMERCIO

RESULTADOS

Los resultados de las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949. Los resultados de las estadísticas de la industria y comercio que se han elaborado durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1950 y el 31 de diciembre de 1951, se han elaborado en virtud de la Ley de Estadística Industrial y Comercial, promulgada el 15 de febrero de 1949.

4.- RESULTADOS

4.A.- Establecimiento de los criterios para la clasificación de las poblaciones celulares aisladas de intestino.

Se ha procedido a la determinación de las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida, en duodeno, yeyuno e íleon.

La fosfatasa alcalina se ha considerado como enzima marcadora de las células superiores de la vello-
sidad, la timidina kinasa, como enzima marcadora de las células indiferenciadas de las criptas, y la fosfatasa ácida, por tener actividad semejante en todas las células de la vello-
sidad, como enzima indicadora de la estabilidad celular.

Las determinaciones enzimáticas se realizaron sobre las preparaciones obtenidas tras la sonicación de las células aisladas, de tres pollos distintos, para ca
da región de estudio.

4.A.1.- Duodeno.

4.A.1.1.- Actividad fosfatasa alcalina.

La tabla 1 (fig. 1) muestra los resultados ob-
tenidos, apreciándose que la actividad fosfatasa alcali-
na es aproximadamente tres veces superior en las célu-
las recogidas durante los primeros veinte min, respecto
de las recogidas en el último periodo (140-160 min), -
disminuyendo gradualmente hasta alcanzar este último va
lor.

4.A.1.2.- Actividad timidina kinasa

La tabla 1 (fig. 1) muestra los resultados obtenidos, pudiendo apreciar que la actividad timidina kinasa es aproximadamente nueve veces inferior en las células recogidas durante los primeros veinte min, respecto de las recogidas en el último periodo de 140-160 min, aumentando gradualmente hasta alcanzar este valor.

4.A.1.3.- Actividad fosfatasa ácida

La tabla 1 (fig. 1) recoge los resultados obtenidos observándose que las variaciones de actividad en cada una de las fracciones recogidas durante el proceso de aislamiento de enterocitos son mínimas.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 1 (fig. 1), se han considerado en duodeno células superiores de la vellosidad, las recogidas durante los primeros 40min; células medias de la vellosidad, las recogidas en los 40 min siguientes (40-80 min); células inferiores de la vellosidad, las recogidas en los 40 min siguientes (80-120 min), y células de las criptas, las recogidas en los últimos 40 min (120-160 min).

4.A.1.4.- Microfotografías de cortes histológicos del duodeno de pollo

En la figura 1' se muestran las microfotografías correspondientes a tres cortes histológicos del duodeno de pollo en tres situaciones distintas: a) corte histológico del duodeno de un pollo control; b) corte histológico del duodeno tras 120 min de incubación en el

DUODENO

<u>Tiempo</u> (min)	<u>Fosfatasa alcalina</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 15 min}$)	<u>Timidina kinasa</u> ($\text{pmol/mg prot x 60 min}$)	<u>Fosfatasa ácida</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 30 min}$)
20	5.71 \pm 0.65	6.04 \pm 1.06	0.66 \pm 0.03
40	3.45 \pm 0.24	6.46 \pm 1.24	0.64 \pm 0.02
60	2.57 \pm 0.24	12.20 \pm 2.80	0.61 \pm 0.01
80	2.27 \pm 0.07	10.86 \pm 0.80	0.63 \pm 0.02
100	2.13 \pm 0.33	24.04 \pm 4.60	0.53 \pm 0.03
120	2.09 \pm 0.25	37.62 \pm 2.20	0.73 \pm 0.01
140	2.05 \pm 0.22	49.60 \pm 2.20	0.70 \pm 0.01
160	1.82 \pm 0.07	51.62 \pm 5.50	0.73 \pm 0.04

Tabla 1.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida de células epiteliales de duodeno, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

DUODENO

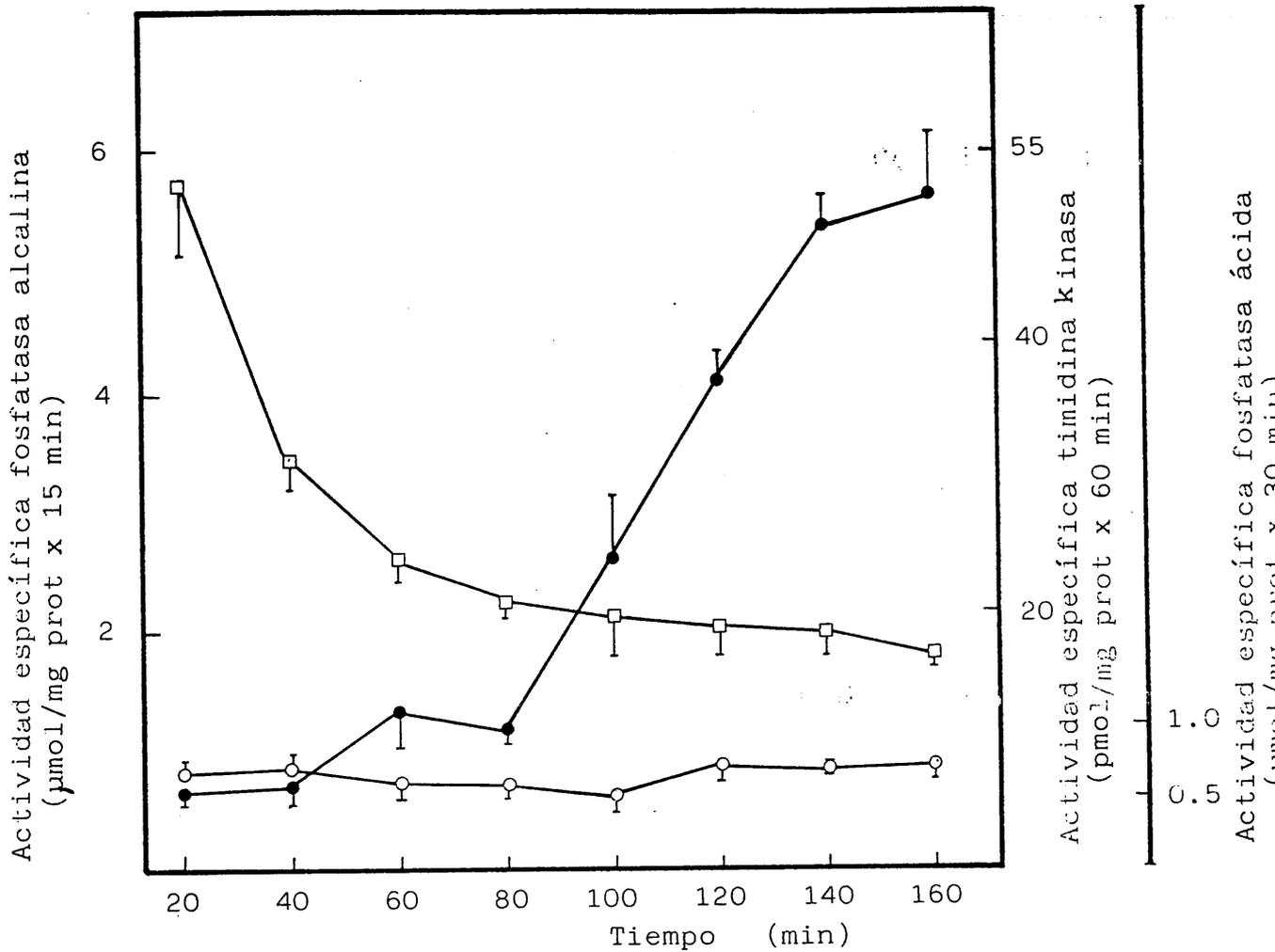


Figura 1.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida, de células epiteliales de duodeno, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. (\square) fosfatasa alcalina; (\circ) fosfatasa ácida; (\bullet) timidina cinasa

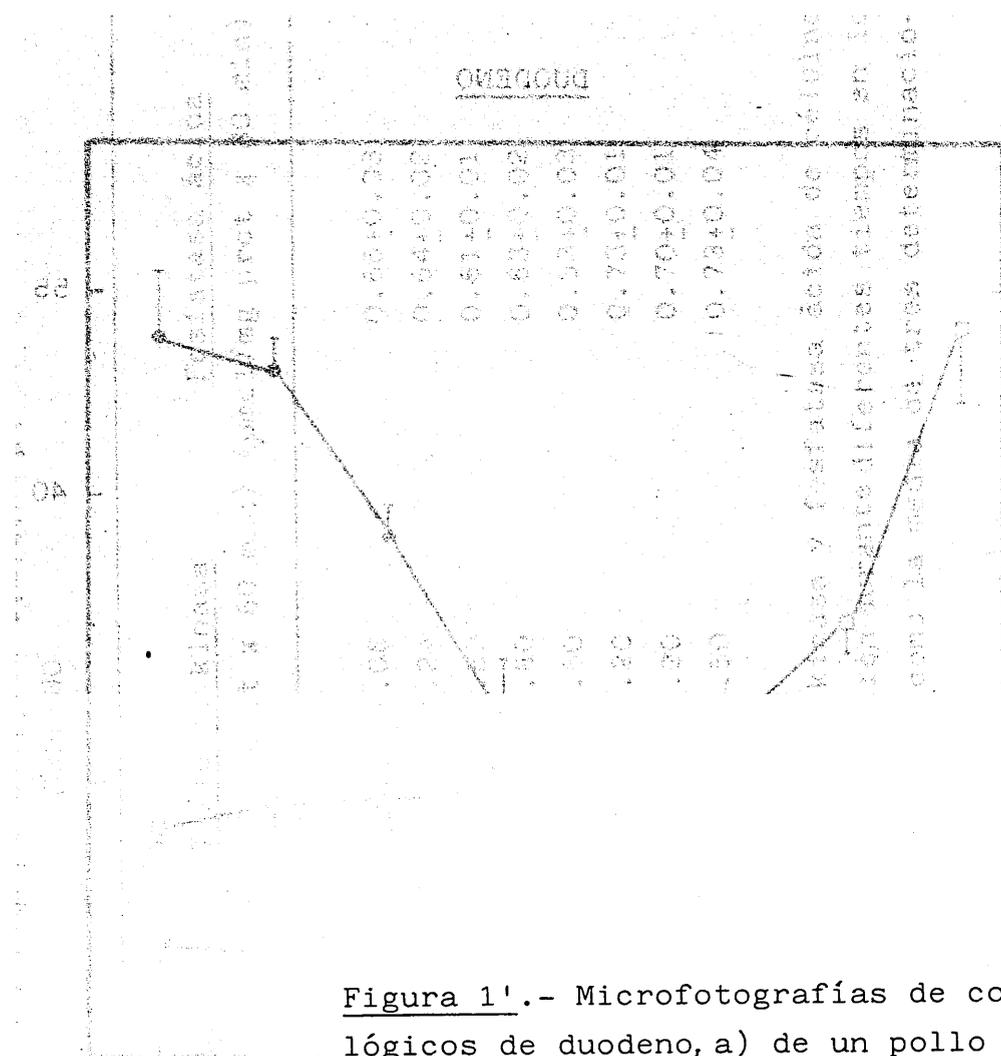


Figura 1'.- Microfotografías de cortes histológicos de duodeno, a) de un pollo control, b) tras 120 min de incubación en el tampón B de aislamiento, y c) tras 160 min de incubación en el mismo tampón. V: vellosidades, C: criptas.

en el tampón B, y c) tras 160 min de incubación en el mismo tampón.

En la microfotografía b puede observarse que tras 120 min de incubación en el tampón de aislamiento, se han desprendido las células epiteliales que recubren la vello- sidad, pero no las de las criptas, en cambio a los 160 min (microfotografía c) se ha conseguido el desprendimiento -- tanto de las células epiteliales de la vellosidad como las de las criptas.

4.A.2.- Yeyuno

4.A.2.1.- Actividad fosfatasa alcalina

En la tabla 2 (fig. 2) se recogen los datos obtenidos, pudiendo observarse que la actividad enzimática -- en la fracción de células obtenidas durante los primeros - 20 min es aproximadamente 5 veces superior a la obtenida - en la última fracción recogida en los 140-160 min, disminu- yendo progresivamente en las distintas fracciones hasta al- canzar este último valor.

4.A.2.2.- Actividad timidina kinasa

La tabla 2 (fig. 2) muestra los resultados obtenidos, pudiéndose apreciar que el valor de la actividad -- timidina kinasa en la fracción recogida durante los prime- ros 20 min es alrededor de 6 veces inferior a la determi- nada en la última fracción, obtenida durante el periodo - 140-160 min, observándose que dicha actividad aumenta gra- dualmente en las distintas fracciones hasta alcanzar este último valor.

4.A.2.3.- Actividad fosfatasa ácida

En la tabla 2 (fig. 2) se muestran los resultados obtenidos, observándose que la actividad fosfatasa ácida - varía mínimamente en cada una de las fracciones celulares obtenidas durante los 160 min de incubación.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 2 (fig. 2), se han considerado, en yeyuno, células superiores de la vellosidad, las recogidas durante los 40 primeros min; células medias de la vellosidad, las recogidas en los 40 min siguientes (40-80 min); células inferiores de la vellosidad, las recogidas en los 40 min siguientes (80-120 min), y células de las criptas, las recogidas en los últimos 40 min (120-160 min).

4.A.2.4.- Microfotografías de cortes histológicos del yeyuno de pollo

En la figura 2' se muestran las microfotografías correspondientes a tres cortes histológicos de yeyuno de pollo en tres situaciones distintas: a) corte histológico del yeyuno de un pollo control; b) corte histológico del yeyuno tras 120 min de incubación en el tampón B, y c) tras 160 min de incubación en el mismo tampón.

En la microfotografía b puede observarse que tras 120 min de incubación en el tampón de aislamiento se han desprendido las células epiteliales que recubren la vellosidad, pero no las de las criptas, en cambio a los 160 min (microfotografía c) se ha conseguido el desprendimiento -- tanto de las células epiteliales de la vellosidad como las de las criptas.

YEYUNO

<u>Tiempo</u> (min)	<u>Fosfatasa alcalina</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 15 min}$)	<u>Timidina kinasa</u> ($\text{pmol/mg prot x 60 min}$)	<u>Fosfatasa ácida</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 30 min}$)
20	25.83 \pm 3.10	3.03 \pm 0.62	1.15 \pm 0.14
40	21.59 \pm 2.30	1.75 \pm 0.17	1.25 \pm 0.17
60	15.81 \pm 1.40	3.64 \pm 0.83	1.30 \pm 0.18
80	12.83 \pm 0.99	6.44 \pm 1.49	1.17 \pm 0.09
100	10.93 \pm 1.22	13.05 \pm 2.92	1.07 \pm 0.09
120	8.53 \pm 0.67	12.15 \pm 2.13	0.98 \pm 0.09
140	4.97 \pm 0.55	14.19 \pm 2.15	0.82 \pm 0.14
160	4.87 \pm 0.71	19.76 \pm 2.34	0.94 \pm 0.22

Tabla 2.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida de células epiteliales de yeyuno, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

YEYUNO

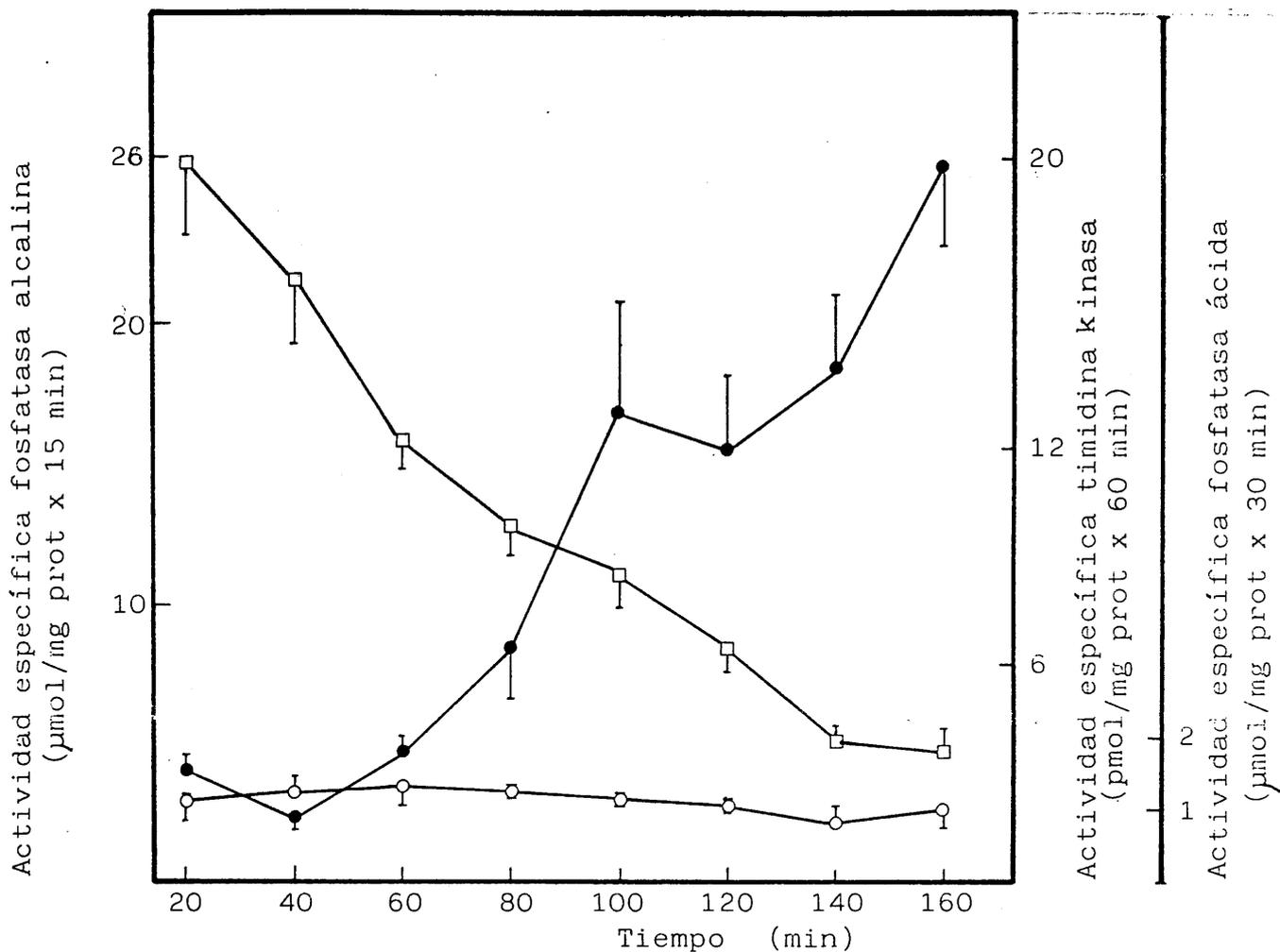


Figura 2.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida, de células epiteliales de yeyuno, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. (\square) fosfatasa alcalina; (\circ) fosfatasa ácida; (\bullet) timidina cinasa.

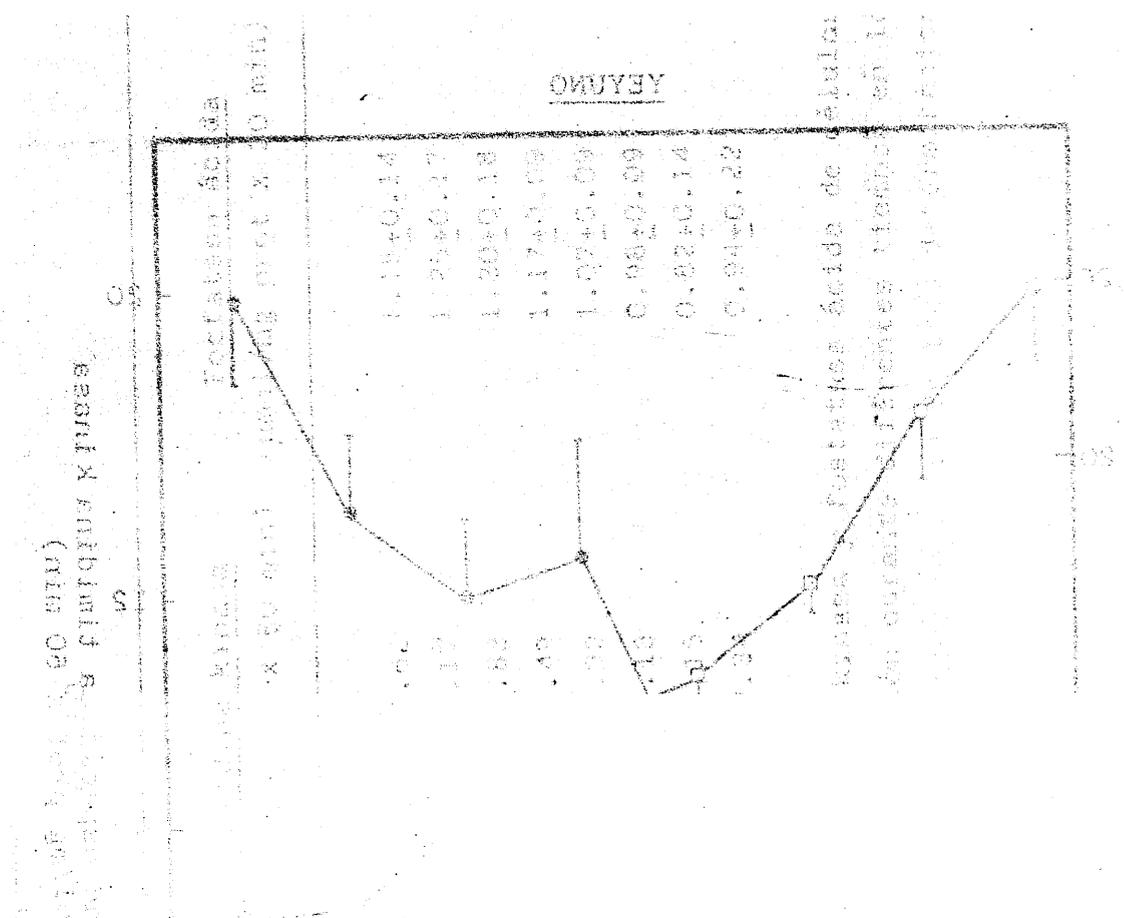
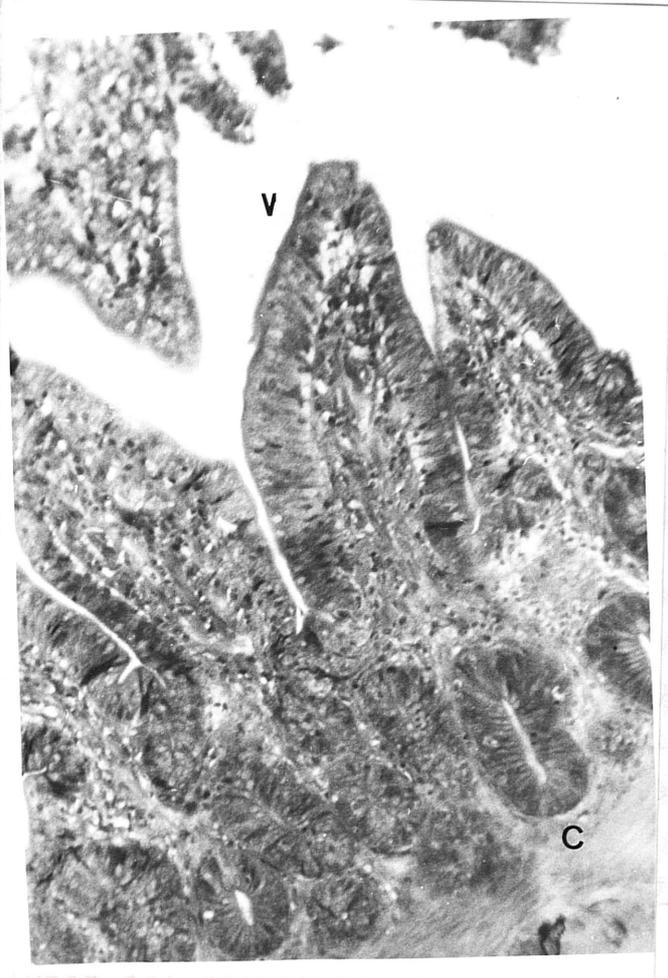


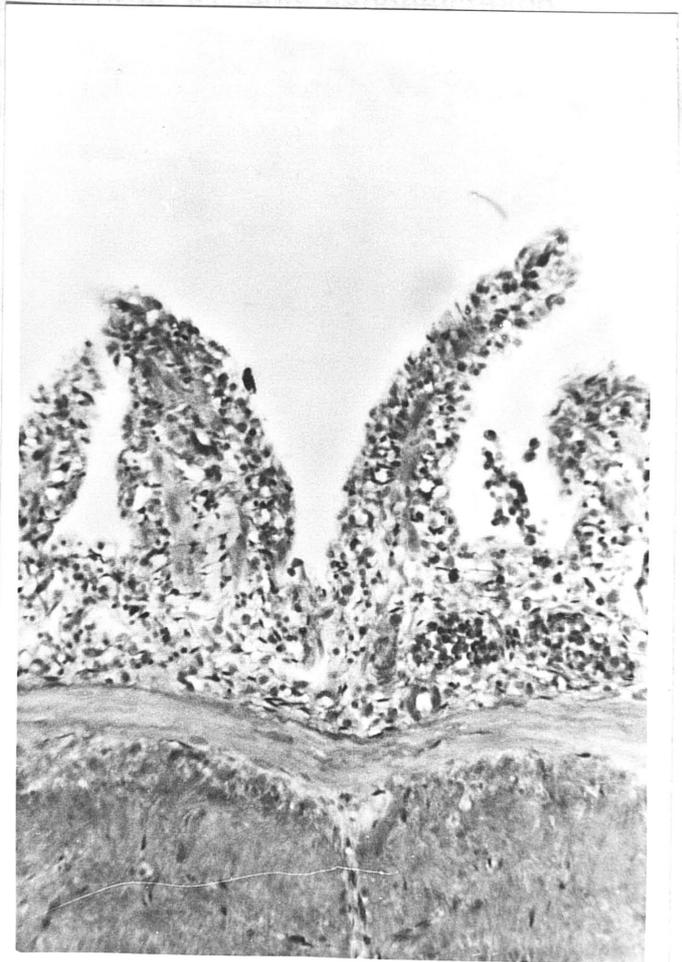
Figura 2'.- Microfotografías de cortes histológicos de yeyuno, a) de un pollo control, b) tras 120 min de incubación en el tampón B de aislamiento, y c) tras 160 min de incubación en el mismo tampón. V: vellosidades, C: criptas.



a



b



c

4.A.3.- Ileon

4.A.3.1.- Actividad fosfatasa alcalina

La tabla 3 (fig. 3) muestra los resultados obtenidos en las distintas fracciones de células recogidas, -- observándose que la actividad fosfatasa alcalina en la fracción obtenida durante los primeros 20 min es alrededor de 14 veces superior, respecto de la determinada en la última fracción (100-120 min), comprobándose así mismo que la actividad va disminuyendo progresivamente en cada una de ellas hasta alcanzar el valor antes mencionado.

4.A.3.2.- Actividad timidina kinasa

La tabla 3 (fig. 3) recoge los resultados obtenidos en cada una de las fracciones de células aisladas, -- observándose que la actividad enzimática en las células recogidas durante los primeros 20 min es alrededor de 5 veces inferior a la determinada en la última fracción (100-120 min), observándose que dicha actividad aumenta gradualmente hasta alcanzar este último valor.

4.A.3.3.- Actividad fosfatasa ácida

La tabla 3 (fig. 3) recoge los resultados obtenidos en cada una de las fracciones de células aisladas. En ella se puede observar que las actividades determinadas en las distintas fracciones varían de forma poco apreciable.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 3 (fig. 3), se han considerado, en íleon, células superiores de la vellosidad, las recogidas durante los primeros 30 min; células medias de la vellosidad, las recogidas du--

rante los 30 min siguientes (30-60 min); células inferiores de la vellosidad, las recogidas durante los 30 min siguientes (60-90 min), y células de las criptas, las recogidas en los últimos 30 min (90-120 min).

4.A.3.4.- Microfotografías de cortes histológicos del íleon de pollo

En la figura 3' se muestran las microfotografías correspondientes a tres cortes histológicos del íleon de pollo en tres situaciones distintas: a) corte histológico del íleon de un pollo control; b) corte histológico del íleon tras 90 min de incubación en el tampón B, y c) tras 120 min de incubación en el mismo tampón.

En la microfotografía b puede observarse, que tras 90 min de incubación en el tampón de aislamiento, se han desprendido las células epiteliales que recubren la vellosidad, pero no las de las criptas, en cambio a los 160 min (microfotografía c), se ha conseguido el desprendimiento tanto de las células epiteliales de la vellosidad como las de las criptas.

ILEON

<u>Tiempo</u> (min)	<u>Fosfatasa alcalina</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 15 min}$)	<u>Timidina kinasa</u> ($\text{pmol/mg prot x 60 min}$)	<u>Fosfatasa ácida</u> ($\mu\text{mol/mg prot x 30 min}$)
20	7.73 \pm 0.03	9.73 \pm 0.19	0.22 \pm 0.01
40	7.04 \pm 0.26	14.80 \pm 1.94	0.21 \pm 0.02
60	5.23 \pm 0.53	13.50 \pm 0.47	0.16 \pm 0.01
80	4.35 \pm 0.38	21.98 \pm 4.22	0.24 \pm 0.02
100	2.72 \pm 0.27	39.64 \pm 1.97	0.24 \pm 0.01
120	0.48 \pm 0.16	51.69 \pm 0.42	0.19 \pm 0.01

Tabla 3.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa, y fosfatasa ácida de células epiteliales de íleon, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

ILEON

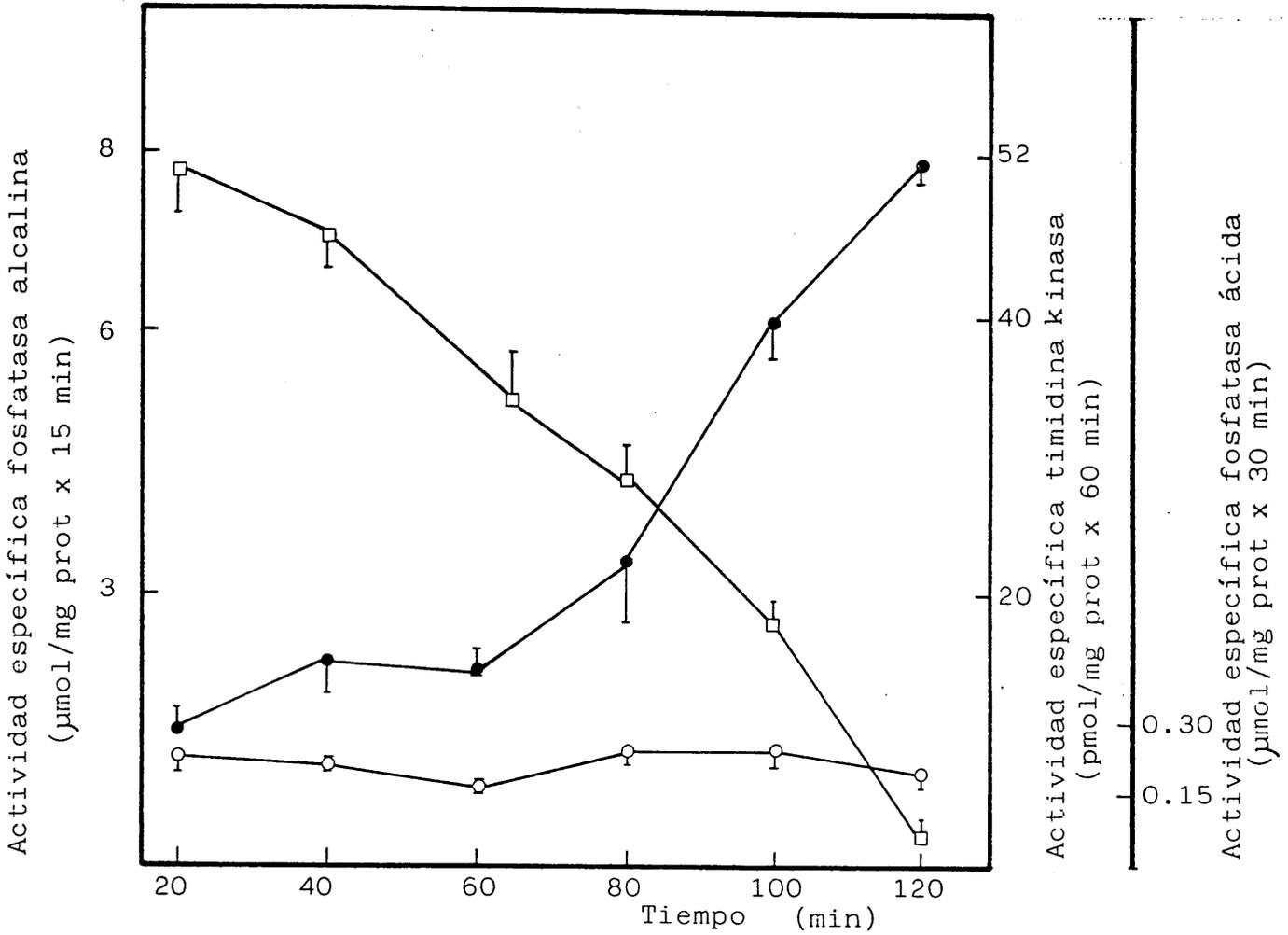


Figura 3.- Actividad fosfatasa alcalina, timidina kinasa y fosfatasa ácida, de células epiteliales de íleon, aisladas mediante incubación durante diferentes tiempos en los tampones de aislamiento. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. (\square) fosfatasa alcalina; (\circ) fosfatasa ácida; (\bullet) timidina cinasa.

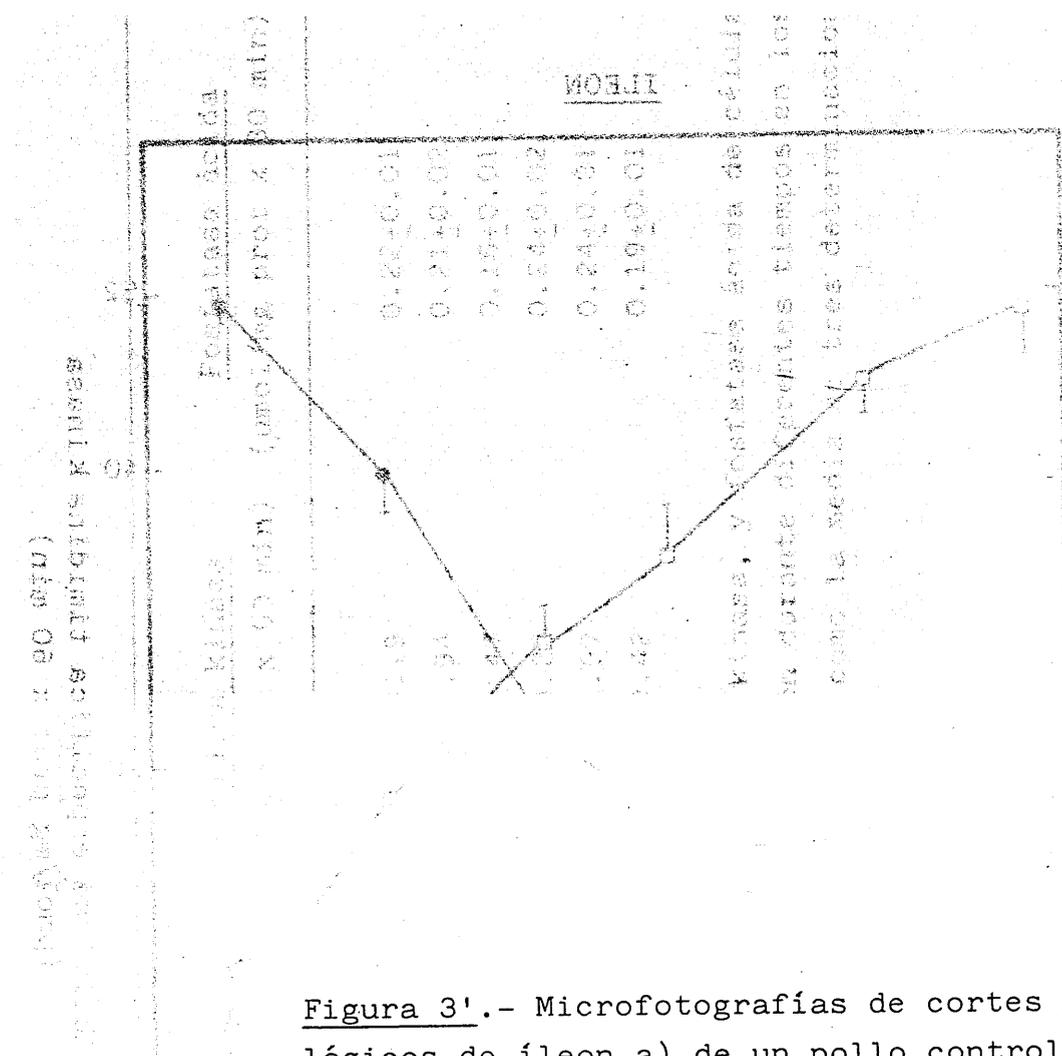
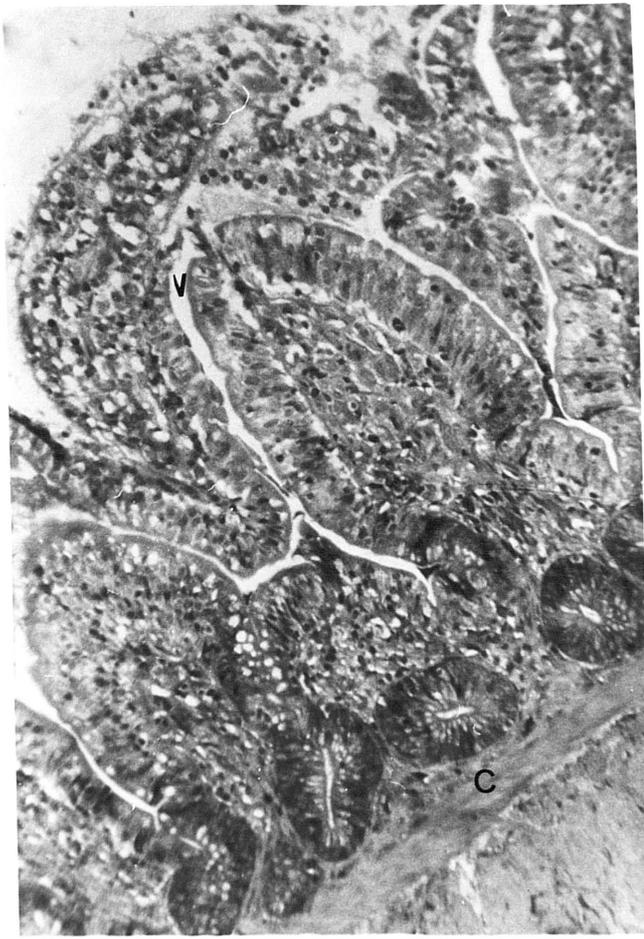


Figura 3'..- Microfotografías de cortes histológicos de íleon, a) de un pollo control, b) tras 90 min de incubación en el tampón B de aislamiento, y c) tras 120 min de incubación en el mismo tampón. V: vellosidades, C: criptas.

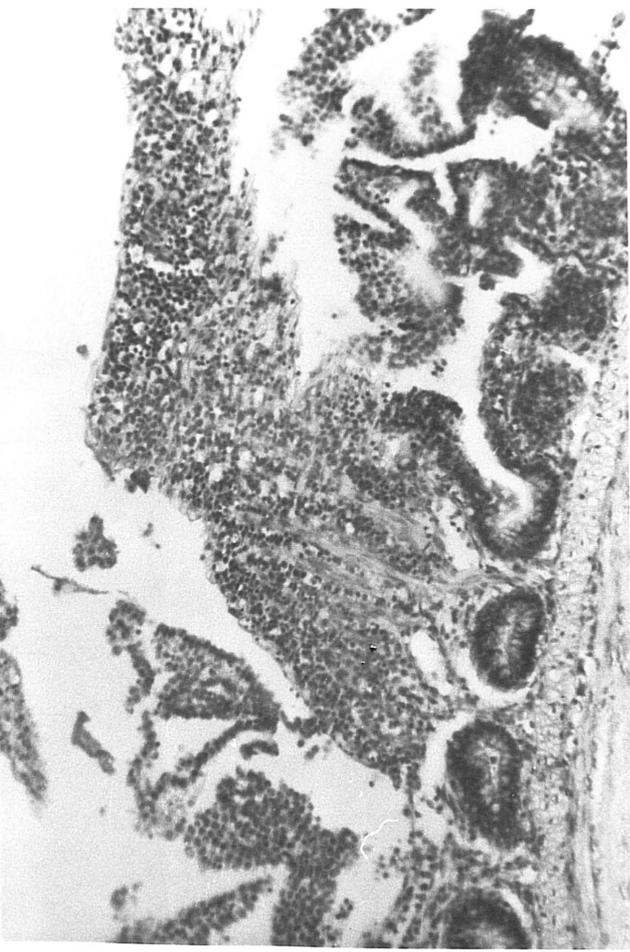
mas para
G-Coa re-
ondito-
n uns --
"pool"
omali
a celula-
(nim)
tres po--
to, en -
alzado
ofendos
aparacion
e
e



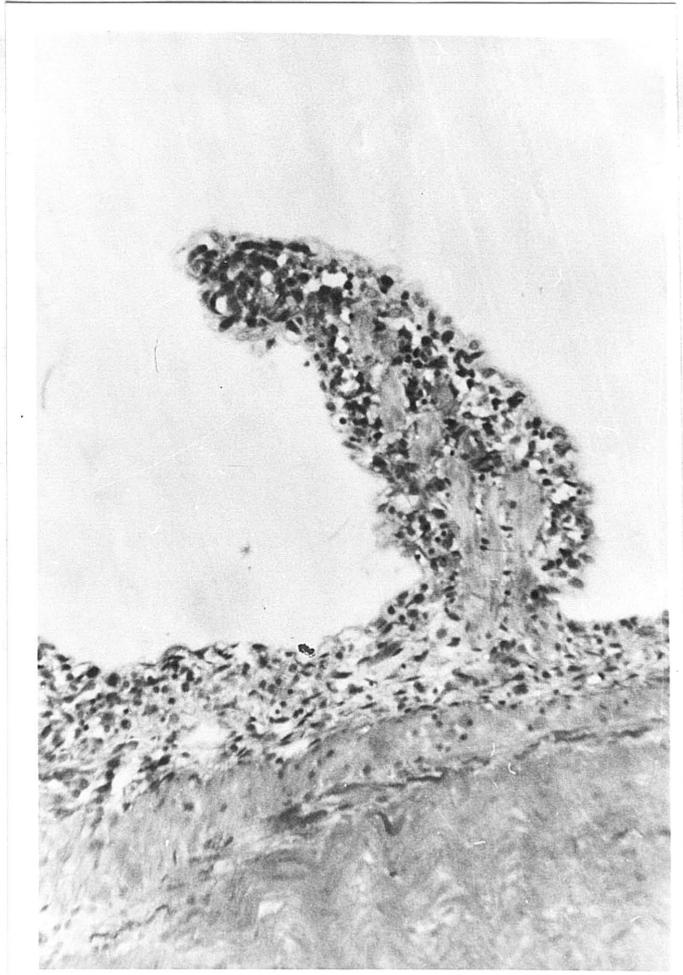
A.B. - Est
el
dus
nes, la a
preparad
de celula
res recog
fios, exc
el que lo
en los di
tres una
enzimatic

A.B.1. - Influencia del tiempo de incubación

La actividad enzimática se incrementa con el tiempo durante la incubación



b



c

4.B.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el ensayo "in vitro" de la actividad HMG-CoA reductasa en enterocitos.

Para el establecimiento de dichas condiciones, la actividad enzimática se ha ensayado en una -- preparación obtenida tras la sonicación de un "pool" de células integrado por todas las fracciones celulares recogidas de duodeno, yeyuno e íleon de tres pollos, excepto en el caso del subfraccionamiento, en el que los ensayos de la actividad se han realizado -- en los distintos sedimentos y sobrenadantes obtenidos tras una centrifugación diferencial de la preparación enzimática antes mencionada.

4.B.1.- Influencia del tiempo de incubación

Para determinar el tiempo óptimo de duración de la reacción enzimática, se han realizado experimentos durante distintos tiempos, que abarcan un intervalo de 0 a 60 min.

La tabla 4 (fig. 4) muestra los resultados obtenidos, observándose que la actividad HMG-CoA reductasa aumenta linealmente hasta los 30 min.

4.B.2.- Influencia de la concentración proteica

Se ha establecido el margen de proporcionalidad entre la cantidad de proteína presente en el medio de reacción y la actividad enzimática. La tabla 5 (fig.5)

Tiempo (min)	Actividad enzimática (pmol/mg prot)
10	589 ₄₈
15	871 ₇₁
30	1538 ₄₉
60	2198 ₇₆

Tabla 4.- Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad HMG-CoA reductasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

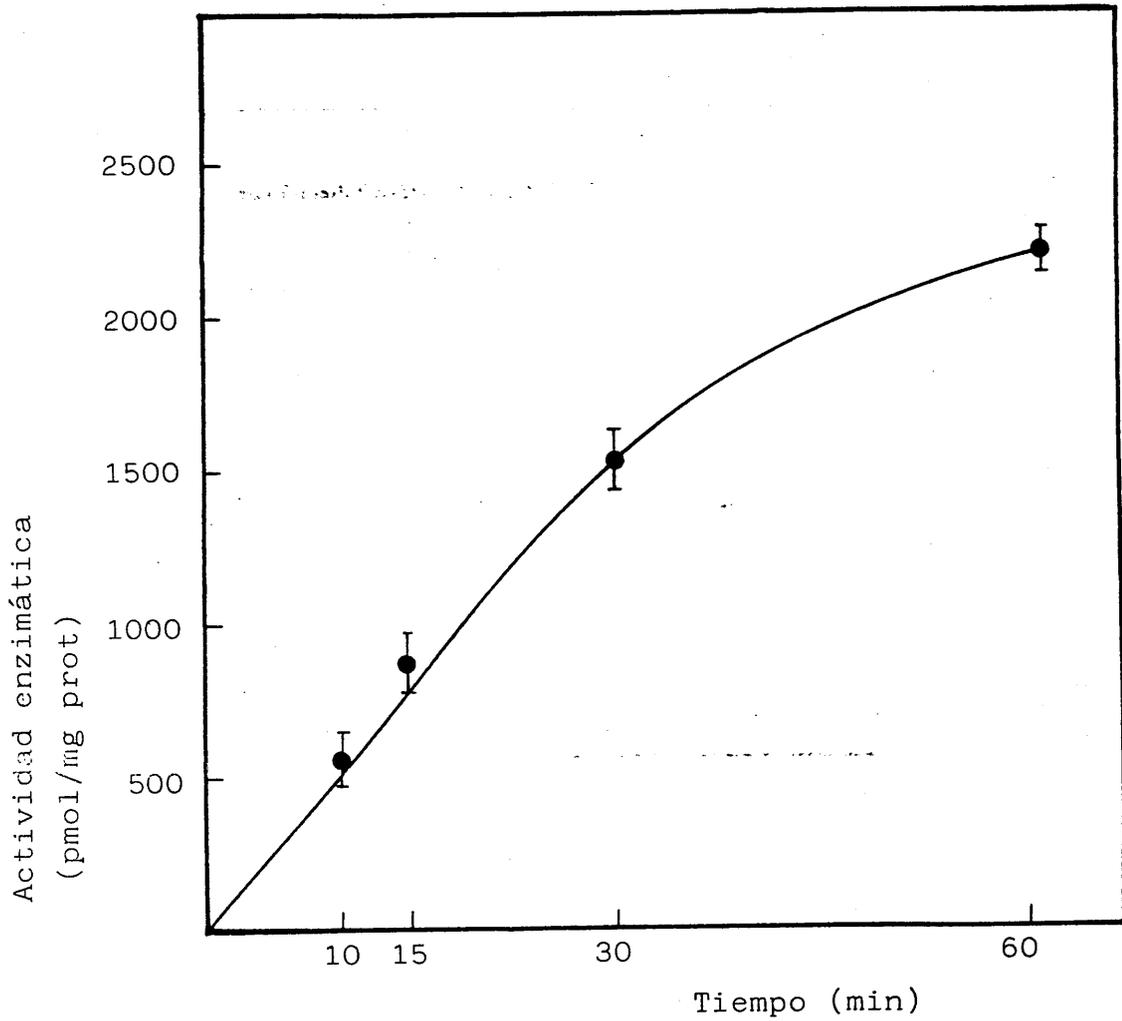


Figura 4.- Influencia del tiempo de incubación, sobre la actividad HMG-CoA reductasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Proteínas (mg)	Actividad enzimática (pmol/min)
0.1	30.1 _± 2.7
0.2	53.1 _± 2.4
0.3	77.3 _± 4.2
0.4	92.5 _± 5.2

Tabla 5.- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad HMG-CoA reductasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

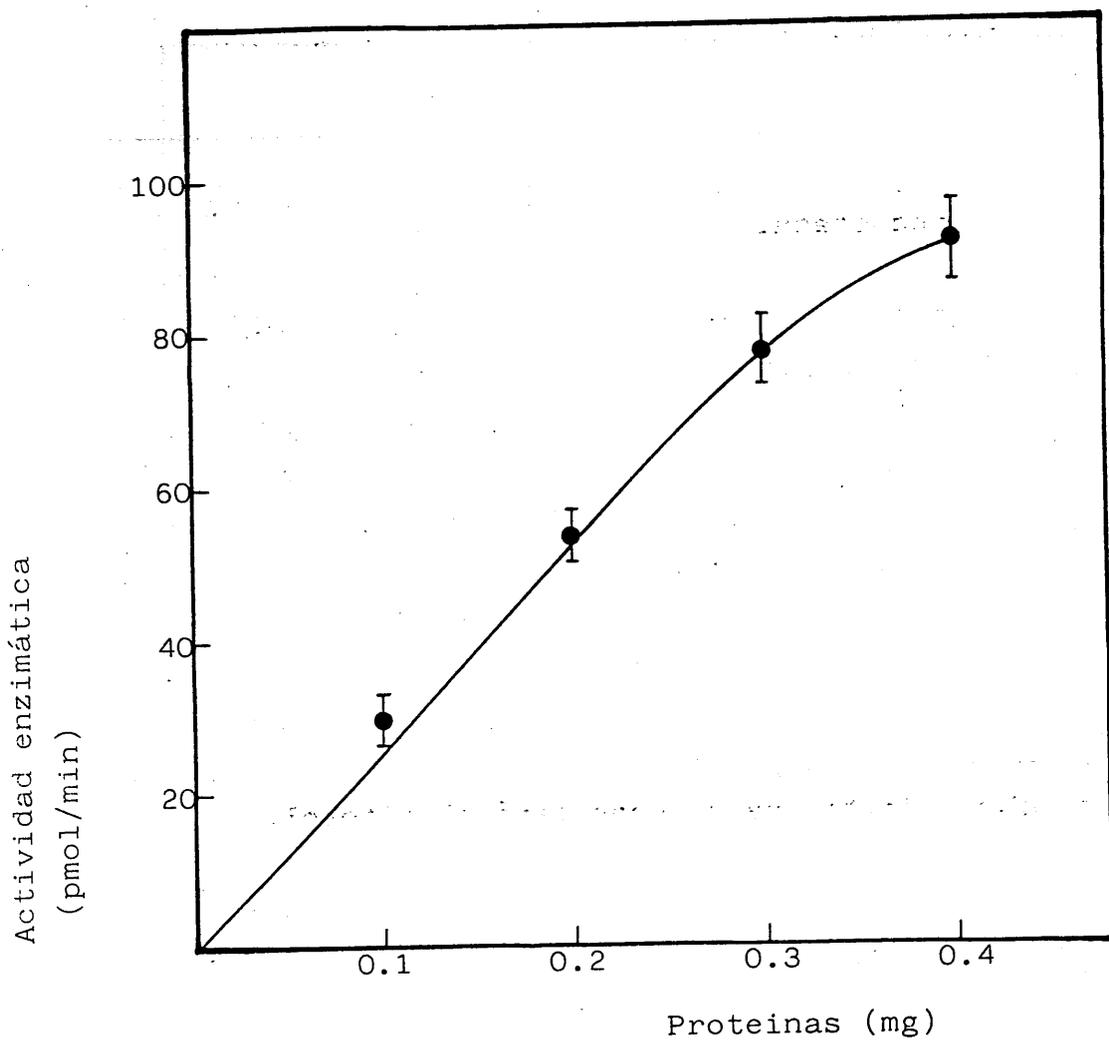


Figura 5..- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad HMG-CoA reductasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

muestra los resultados obtenidos tras realizar experiencias en presencia de distintas cantidades de proteína, hasta un máximo de 0.4 mg. La actividad HMG-CoA reductasa aumenta linealmente hasta aproximadamente 0.3 mg de proteína.

4.B.3.- Distribución subcelular de la actividad HMG-CoA reductasa.

Para determinar la distribución subcelular de la actividad HMG-CoA reductasa, se sometió la preparación enzimática a una centrifugación diferencial. Como fracción nuclear se consideró el sedimento obtenido por centrifugación a 5000 x g durante 15 min. Como fracción mitocondrial, se consideró el sedimento de la centrifugación del sobrenadante anterior a 15000 x g durante 15 min. De la centrifugación a 105000 x g durante 60 min del sobrenadante anterior, se obtuvo un sedimento, que se consideró como la fracción microsomal, y un sobrenadante que se consideró el citosol.

La tabla 6 recoge los valores obtenidos, en términos de actividad específica y actividad total, en cada una de las fracciones subcelulares ensayadas, apreciándose que la máxima actividad específica se observó en la fracción microsomal, la mínima en la fracción citosólica, detectándose igualmente actividades relativamente altas en las fracciones nuclear y mitocondrial.

4.B.4.- Influencia del inhibidor de la tripsina sobre la actividad HMG-CoA reductasa

Para comprobar el efecto que el inhibidor de

Fracción subcelular	Actividad específica (pmol/mg prot x min)	Actividad total (pmol/min)
Homogenado	53.5 _± 3.1	5837 _± 231
Núcleos	65.5 _± 4.0	1207 _± 80
Mitocondrias	97.2 _± 8.3	478 _± 39
Microsomas	164.2 _± 4.2	2406 _± 60
Citosol	4.2 _± 0.6	73 _± 80

Tabla 6.- Actividad HMG-CoA reductasa en las distintas fracciones subcelulares de células aisladas de intestino. Cada punto representa la media de tres determinaciones ± S.E.M.

Región de intestino	Actividad HMG-CoA reductasa + Inhibidor tripsina (pmol/mg prot x min)	Actividad HMG-CoA reductasa - Inhibidor tripsina (pmol/mg prot x min)
Duodeno	6.7±0.4	5.8±0.2
Yeyuno	8.3±0.9	7.7±0.6
Ileon	10.4±0.9	9.7±1.1

Tabla 7.- Efecto del inhibidor de la tripsina sobre la actividad HMG-CoA reductasa en mucosa raspada de duodeno, yeyuno e íleon. Los resultados se expresan como la media - de tres determinaciones ± S.E.M.

la tripsina puede tener sobre la actividad HMG-CoA reductasa, se raspó mucosa de duodeno, yeyuno e íleon. - De cada una de las tres regiones se hicieron dos lotes, uno de ellos se resuspendió en el tampón de homogenización normal de la HMG-CoA reductasa y el otro en el mismo tampón, al que además se le añadió inhibidor de la tripsina (2 mg/ml). La homogenización se realizó con un "potter" mecánico.

Los resultados son los que se muestran en la tabla 7, observándose que los valores de la actividad HMG-CoA reductasa obtenidos en las preparaciones que habían sido homogeneizadas en el tampón que no contenía inhibidor de la tripsina, representan alrededor del 90% de las determinadas en la preparación que sí contenía inhibidor de la tripsina.

4.C.- Establecimiento de las condiciones óptimas para el ensayo "in vitro" de la actividad PPMVA des-carboxilasa en enterocitos.

Para el establecimiento de dichas condiciones, la actividad enzimática se ha ensayado en una preparación obtenida tras la sonicación de un "pool" de células integrado por todas las fracciones celulares recogidas de duodeno, yeyuno e íleon, de 3 pollos, excepto para el subfraccionamiento, en el que los ensayos de la actividad se han realizado en los distintos sedimentos y sobrenadantes obtenidos tras una centrifugación diferencial de la preparación enzimática antes mencionada.

4.C.1.- Influencia del tiempo de incubación

Para determinar el tiempo óptimo de duración de la reacción enzimática, se han realizado experien--

Tiempo (min)	Actividad enzimática (nmol/mg prot)
5	0.42 _± 0.03
10	0.65 _± 0.03
15	1.04 _± 0.04
30	1.77 _± 0.06
60	3.56 _± 0.09

Tabla 8.- Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

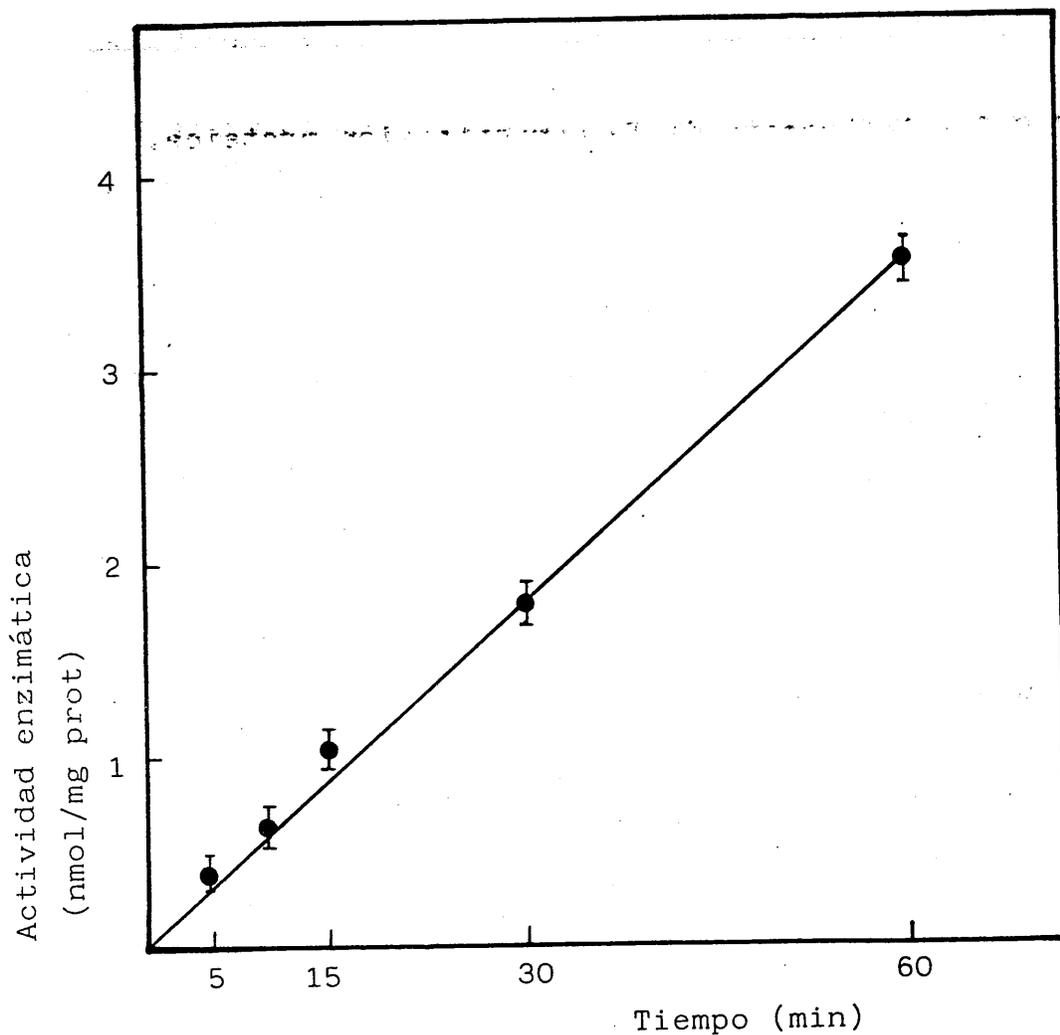


Figura 6.- Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

cias durante distintos tiempos que abarcan un intervalo de 0 a 60 min.

La tabla 8(fig.6), muestra los resultados obtenidos, observándose que la actividad PPMVA descarboxilasa aumenta linealmente durante el tiempo ensayado.

4.C.2.- Influencia de la concentración proteica.

Con objeto de determinar el margen de proporcionalidad entre la concentración proteica y la cantidad de productos formados, se han llevado a cabo experiencias en presencia de distintas concentraciones de proteína de la preparación enzimática.

La tabla 9 (fig. 7) muestra los resultados obtenidos, observándose que la actividad PPMVA descarboxilasa aumenta linealmente hasta la máxima concentración ensayada.

4.C.3.- Distribución subcelular de la actividad PPMVA descarboxilasa.

Para determinar la distribución subcelular de la actividad PPMVA descarboxilasa, se sometió la preparación enzimática a una centrifugación diferencial, tal como se especifica en el punto 4.B.3.

La tabla 10 muestra los valores obtenidos, en términos de actividad específica y actividad total, en cada una de las fracciones subcelulares estudiadas, observándose que la máxima actividad específica es recogida en la fracción "citosol", siendo la actividad de las restantes fracciones subcelulares sensiblemente más baja.

Proteínas (mg)	Actividad enzimática (pmol/min)
0.05	3.0 \pm 0.1
0.10	6.4 \pm 0.1
0.15	9.2 \pm 0.1
0.20	12.4 \pm 0.2
0.30	19.4 \pm 0.2

Tabla 9.- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

estot habividos y solividoso deprevilios yi supuliz, y
 luid pmmva drcarboxilasa. Los resultados se expresan como
 la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

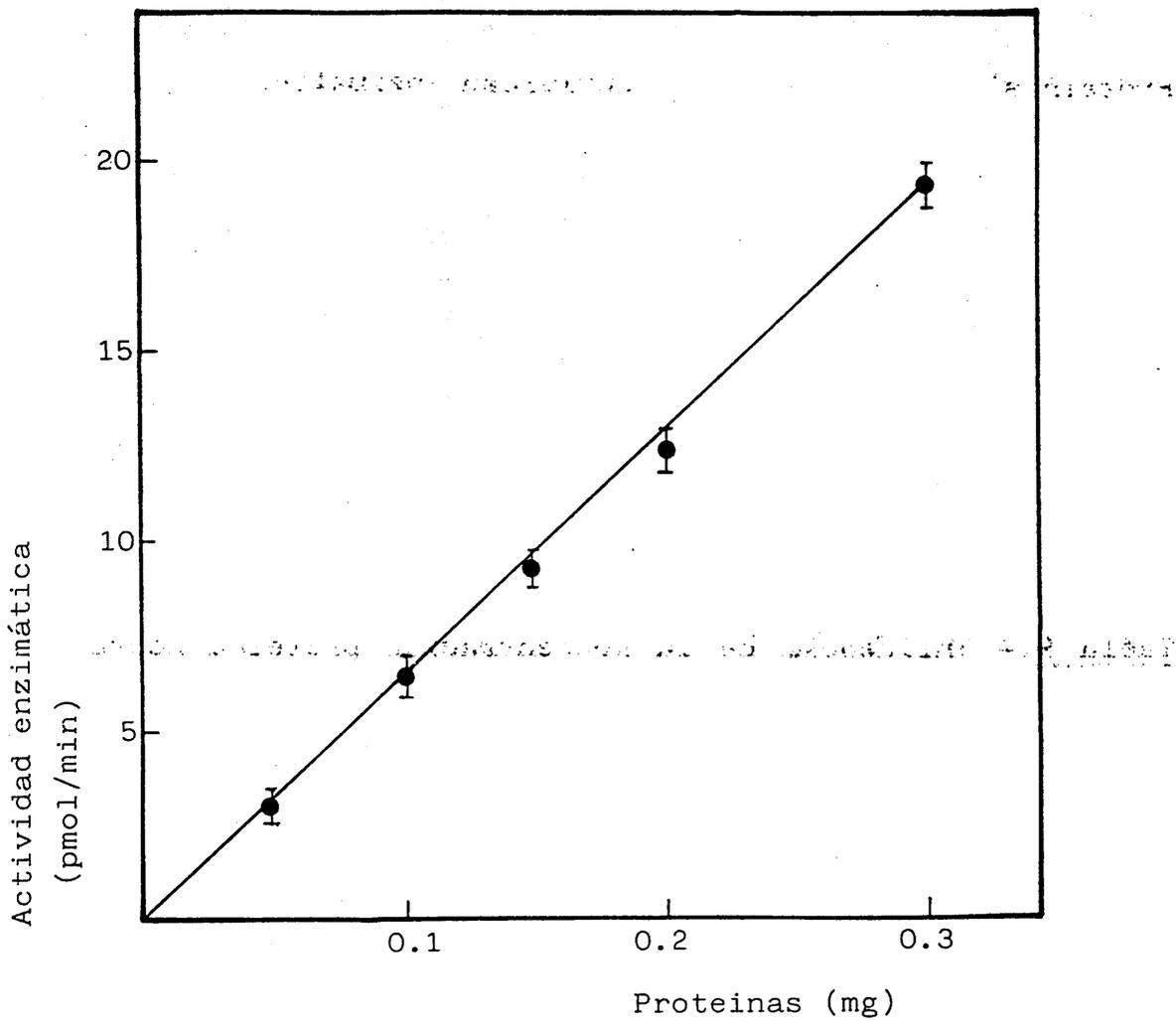


Figura 7.- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, de células epiteliales aisladas de intestino. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Fracción subcelular	Actividad específica (pmol/mg prot x min)	Actividad total (nmol/min)
Homogenado	111.6 \pm 2.1	12.10 \pm 0.25
Núcleos	23.0 \pm 1.5	0.55 \pm 0.03
Mitocondrias	12.4 \pm 1.5	0.18 \pm 0.02
Microsomas	7.6 \pm 1.1	0.13 \pm 0.01
Citosol	423.0 \pm 6.0	14.93 \pm 0.87

Tabla 10.- Actividad PPMVA descarboxilasa en las distintas fracciones subcelulares de células epiteliales aisladas de intestino. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

4.D. Establecimiento de las condiciones óptimas para el ensayo "in vitro" de la actividad ACAT en enterocitos.

A fin de establecer las condiciones óptimas para el ensayo de la actividad ACAT, se ha partido de una preparación enzimática obtenida tras la sonicación de un "pool" de células formado por todas las fracciones celulares recogidas en duodeno, yeyuno e íleon de tres pollos, excepto para el subfraccionamiento, en el que los ensayos de la actividad se han realizado en los distintos sedimentos y sobrenadantes obtenidos tras una centrifugación diferencial de la preparación enzimática antes mencionada.

4.D.1.- Influencia del tiempo de incubación.

Para determinar el tiempo óptimo de duración de la reacción enzimática, se han realizado experiencias durante distintos tiempos, que abarcan un intervalo de 0 a 10 min.

La tabla 11 (fig. 8), muestra los resultados obtenidos, observándose que la actividad ACAT aumenta linealmente hasta los 2 min.

4.D.2.- Influencia de la concentración proteica.

Se ha establecido el margen de proporcionalidad entre la cantidad de proteína presente en el medio de reacción y la actividad enzimática.

La tabla 12 (fig. 8) muestra los resultados obtenidos tras realizar experiencias en presencia de distintas cantidades de proteína, hasta un máximo de -

Tiempo (min)	Actividad enzimática (pmol/mg prot)
1	233 ₋ 12
2	413 ₋ 23
3	521 ₋ 34
5	566 ₋ 18
10	753 ₋ 49

Tabla 11.- Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad ACAT de células epiteliales aisladas de intestino. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

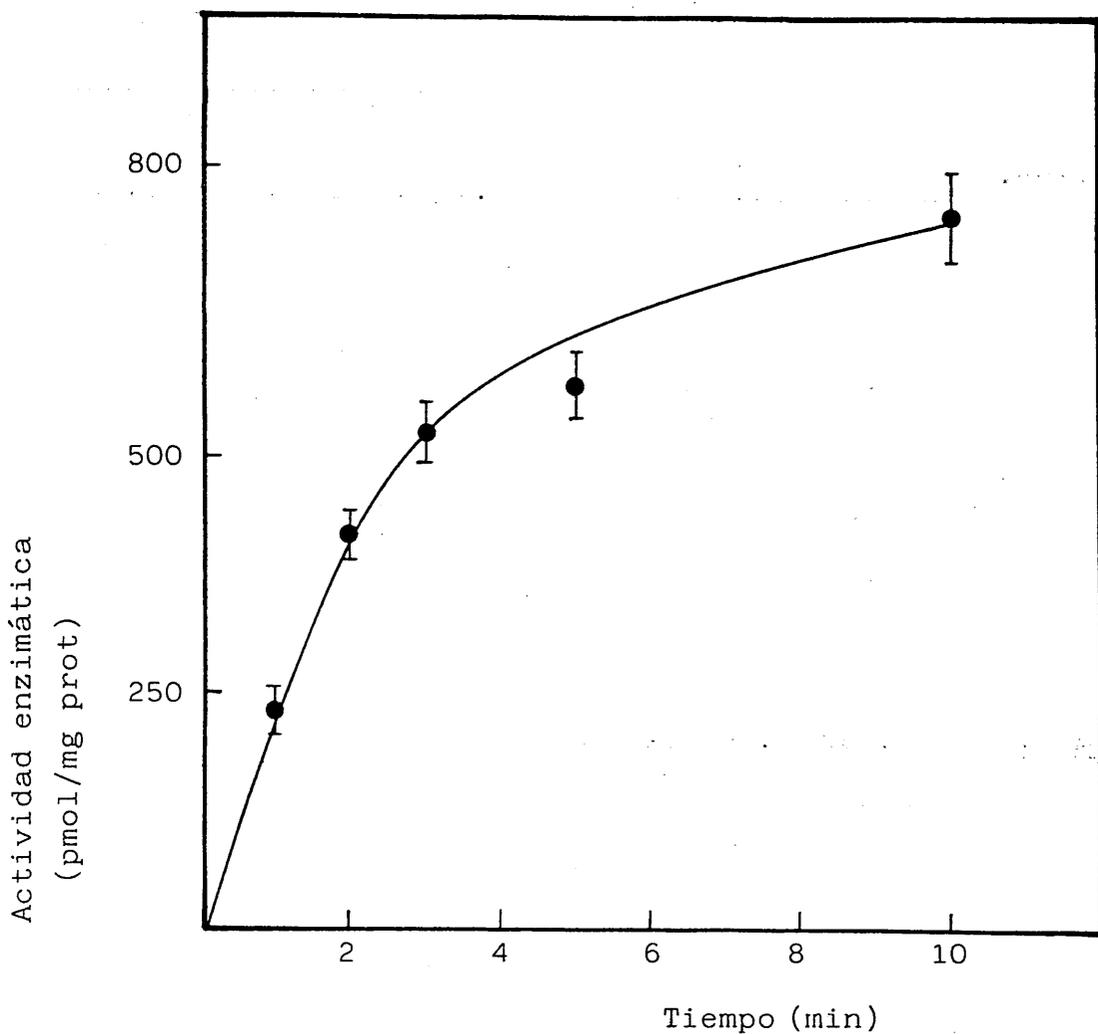


Figura 8.- Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad ACAT, de células epiteliales aisladas de intestino. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Proteínas (mg)	Actividad enzimática (pmol/min)
0.05	13.2 _± 1.2
0.10	35.3 _± 1.2
0.20	74.0 _± 1.0
0.30	138.6 _± 6.1
0.40	147.2 _± 3.6

Tabla 12.- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad ACAT de células epiteliales aisladas de intestino. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

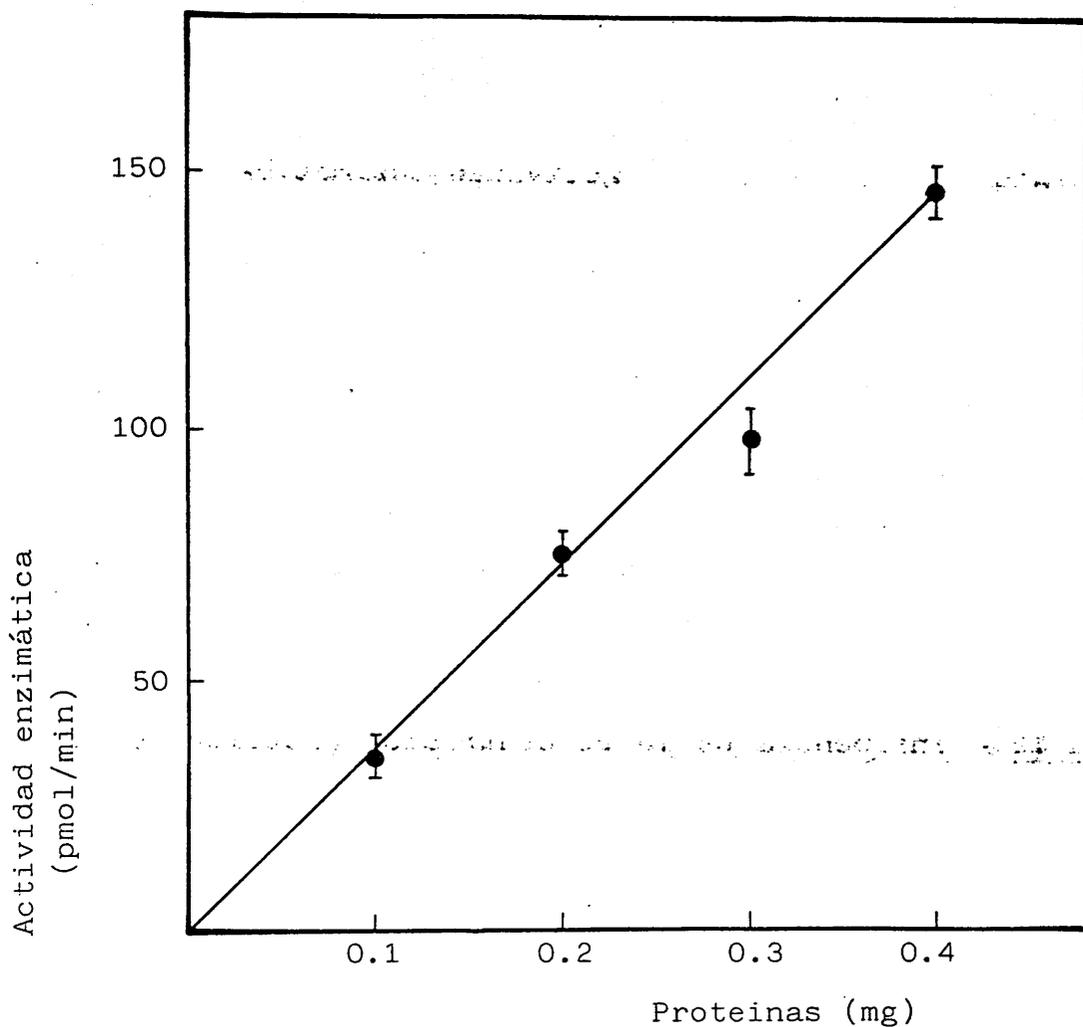


Figura 9.- Influencia de la concentración proteica sobre la actividad ACAT, de células epiteliales aisladas de intestino. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Fracción subcelular	Actividad específica (nmol/mg prot x min)	Actividad total (nmol/min)
Homogenado	317.5 \pm 17.5	37.8 \pm 1.8
Núcleos	342.1 \pm 10.4	9.8 \pm 0.4
Mitocondrias	863.3 \pm 13.6	9.7 \pm 0.3
Microsomas	485.4 \pm 57.4	7.8 \pm 0.9
Citosol	15.8 \pm 1.6	0.4 \pm 0.1

Tabla 13.- Actividad ACAT en las distintas fracciones subcelulares de células epiteliales de intestino. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

0.4 mg. La actividad ACAT aumenta linealmente dentro del rango de concentraciones ensayado.

4.D.3.- Distribución subcelular de la actividad ACAT.

Para determinar la distribución subcelular de la actividad ACAT, se sometió la preparación enzimática a una centrifugación diferencial, tal como se especifica en el punto 4.B.3.

La tabla 13 muestra los valores obtenidos en términos de actividad específica y actividad total, en cada una de las fracciones subcelulares estudiadas, observándose que la máxima actividad específica se obtuvo, en contra de lo esperado, en la fracción "mitocondria" y la mínima en la fracción "citosol".

4.E.- Variaciones en la actividad HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa y ACAT en mucosa raspada de duodeno, yeyuno e íleon.

A fin de establecer las diferencias en la actividad enzimática a lo largo del intestino, se realizaron los ensayos de cada una de las tres enzimas mencionadas en mucosa raspada, con el objeto de poder comparar los resultados con los obtenidos en enterocitos aislados.

Los valores determinados se muestran en la tabla 14, no apreciándose diferencias notables en la actividad PPMVA descarboxilasa, y sí en la HMG-CoA reductasa y ACAT, entre las tres regiones comparadas.

4.F.- Variaciones del metabolismo lipídico a lo largo del eje longitudinal y transversal del intestino

Tanto la determinación de las distintas acti

Región intestino	HMG-CoA reductasa (pmol/mg prot x min)	PPMVA descarboxilasa (pmol/mg prot x min)	ACAT (pmol/mg prot x min)
Duodeno	4.4 _± 0.3	45.5 _± 1.5	47.7 _± 1.4
Yeyuno	7.8 _± 0.6	40.6 _± 1.0	58.4 _± 5.2
Ileon	8.9 _± 0.7	57.2 _± 3.3	17.9 _± 1.2

Tabla 14.- Diferencias de actividad específica HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa y ACAT en mucosa raspada de duodeno, yeyuno e íleon. Los resultados se expresan como la media de cuatro determinaciones \pm S.E.M.

Tanto la determinación de las distintas actividades enzimáticas, como la del contenido en colesterol, se realizaron en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon de tres pollos diferentes. A su vez, en cada una de estas tres regiones se distinguió entre células superiores de la vellosidad, medias inferiores y células de las criptas.

4.F.1.- Variaciones del contenido en colesterol.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 15 (fig.10), observándose que entre duodeno y yeyuno no se aprecian diferencias ni en el contenido en colesterol total ni en el libre, siendo en ambas regiones los valores inferiores a los determinados en íleon.

En todos los casos, el colesterol libre representa en torno al 95% del total de la célula.

4.F.2.- Variaciones en la actividad HMG-CoA reductasa.

Los resultados expuestos en la tabla 16 (fig. 11), muestran las variaciones de actividad HMG-CoA reductasa, en términos de actividad específica, a lo largo del eje longitudinal y transversal del intestino. En ella se puede apreciar que la actividad enzimática en duodeno es sensiblemente inferior a la determinada en yeyuno e íleon.

En la tabla 17 (fig. 12) se exponen las variaciones de actividad HMG-CoA reductasa, en términos de actividad total. En ella se aprecia que tanto en duodeno, yeyuno e íleon, las células superiores y medias de la vellosidad, son las que contribuyen cuantitativamente en mayor grado a la formación de MVA.

Fracción celular	Duodeno		Yeyuno		Ileon	
	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>
VS	9.2 \pm 0.3	9.0 \pm 0.3	8.7 \pm 1.1	8.3 \pm 0.7	16.0 \pm 0.2	15.6 \pm 0.2
VM	10.9 \pm 0.3	9.9 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	16.6 \pm 0.2	16.4 \pm 0.5
VI	11.1 \pm 0.4	9.7 \pm 0.9	8.3 \pm 0.2	7.7 \pm 0.2	14.9 \pm 0.3	14.1 \pm 0.3
C	9.1 \pm 0.2	8.7 \pm 0.1	12.4 \pm 0.5	12.3 \pm 0.5	17.1 \pm 0.3	16.0 \pm 0.3

Tabla 15.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Cada punto representa la media de dos de terminaciones \pm S.E.M.

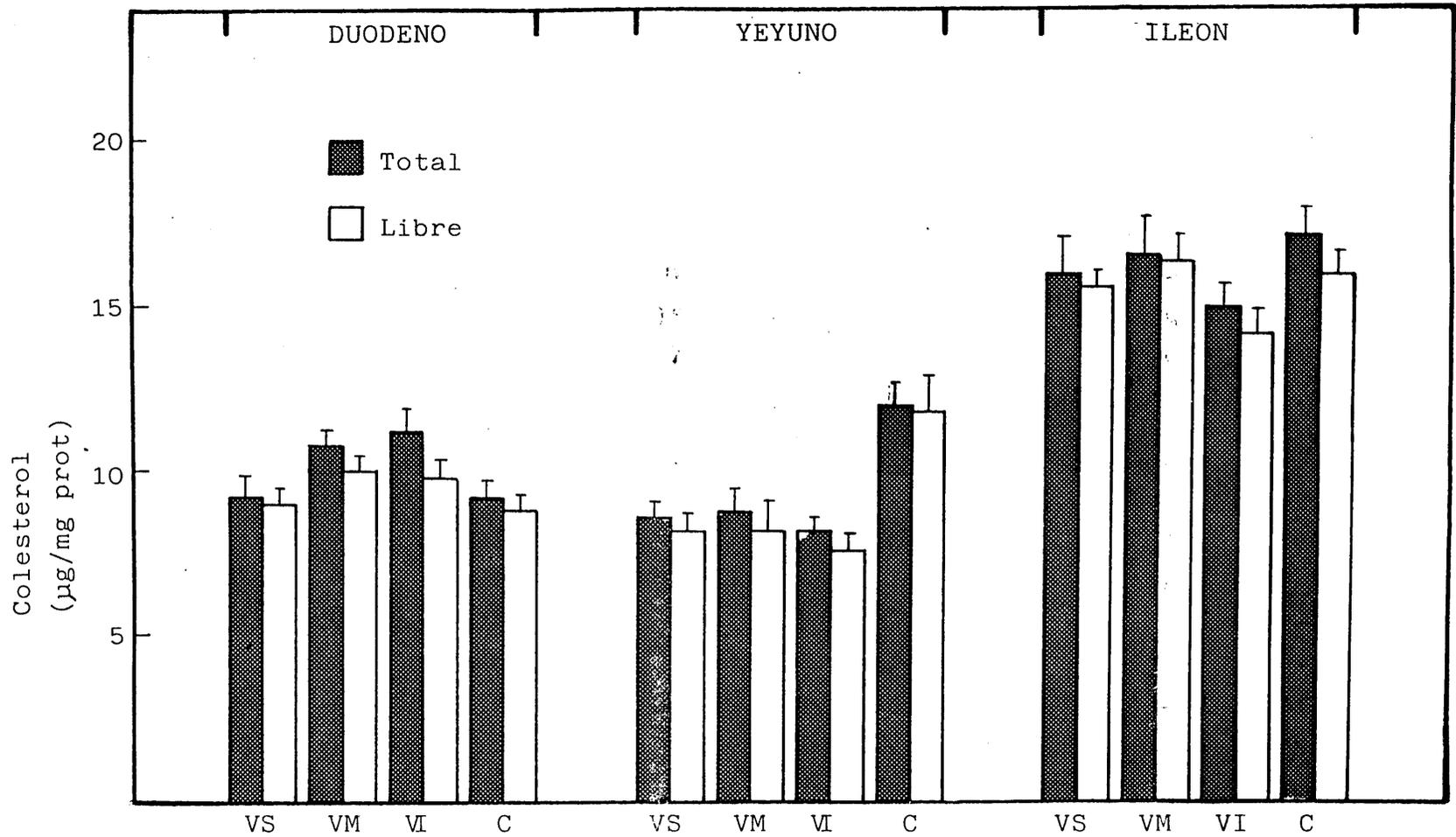


Figura 10.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores; C: células de las criptas. Los valores se representan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica HMG-CoA reductasa (pmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	19.7 \pm 1.2	90.4 \pm 8.0	73.3 \pm 3.4
VM	20.4 \pm 1.5	90.6 \pm 3.5	80.0 \pm 5.1
VI	22.0 \pm 4.0	84.6 \pm 3.0	65.3 \pm 3.0
C	20.3 \pm 0.5	68.8 \pm 1.1	56.5 \pm 1.2

Tabla 16.- Actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y c: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media - de tres determinaciones \pm S.E.M.

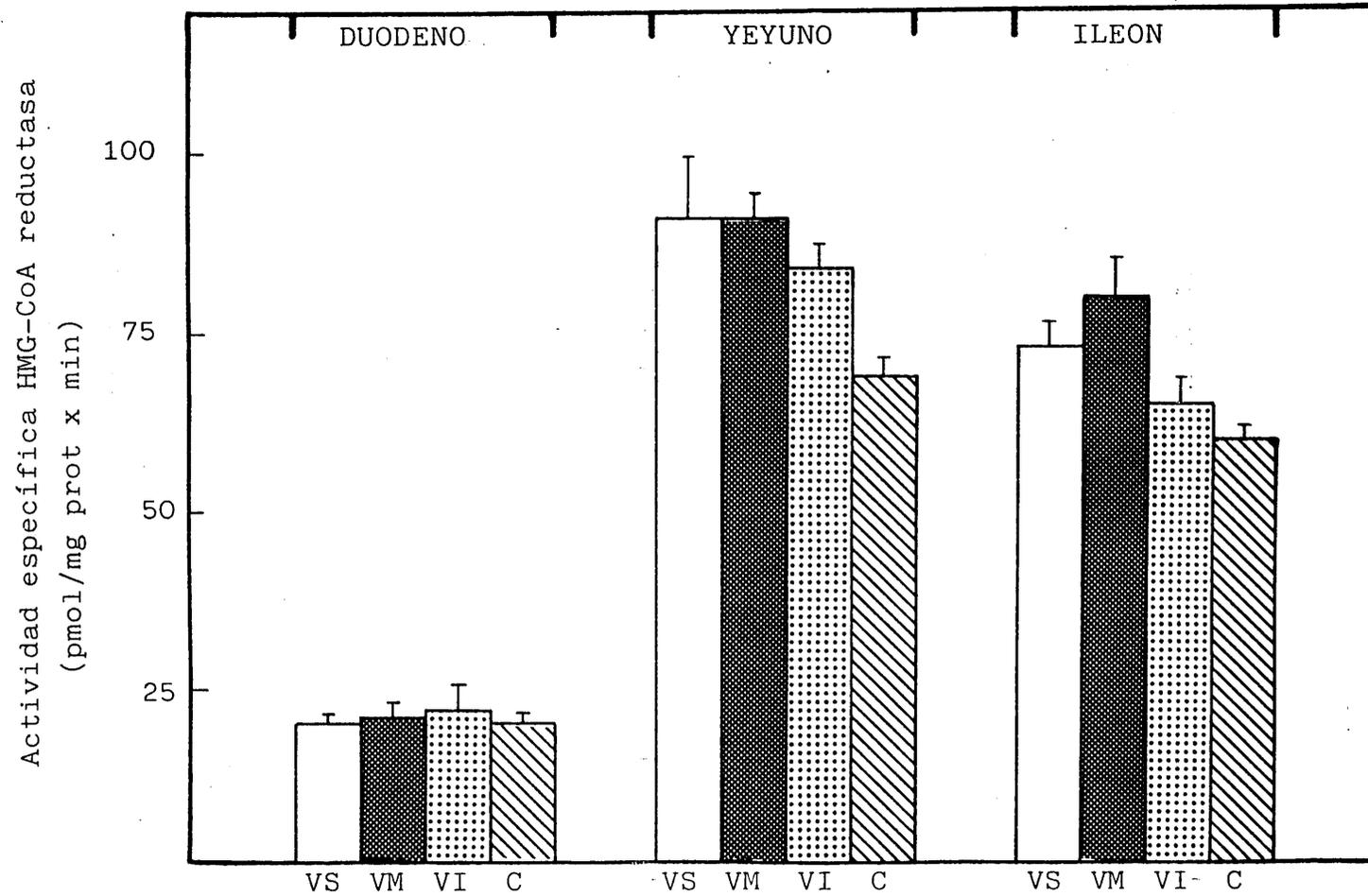


Figura 11.- Actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total HMG-CoA reductasa (nmol/min)			
Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	1.75 _± 0.10	2.53 _± 0.22	1.45 _± 0.07
VM	1.19 _± 0.09	2.09 _± 0.08	2.83 _± 0.18
VI	0.75 _± 0.13	1.31 _± 0.05	1.78 _± 0.11
C	0.68 _± 0.12	0.61 _± 0.02	0.56 _± 0.01

Tabla 17.- Actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como media de tres de terminaciones _± S.E.M.

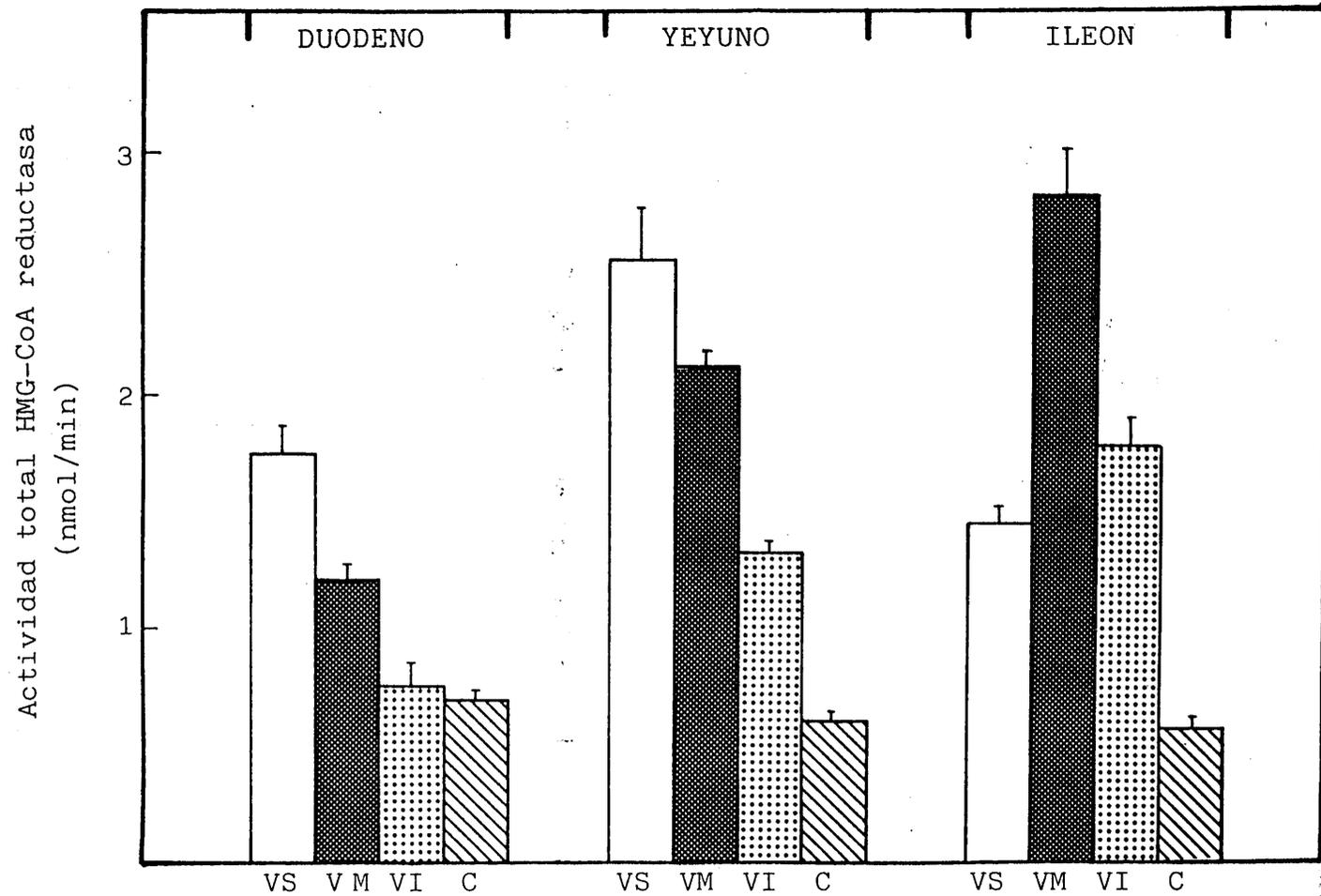


Figura 12.- Actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VI:células inferiores; VM:células medias; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

4.F.3.- Variaciones en la actividad PPMVA descarboxilasa.

Los cambios observados para la actividad PPMVA descarboxilasa se muestran en la tabla 18 (fig. 13). - Se puede apreciar que la actividad específica apenas - si varía a lo largo del eje longitudinal; en cambio en el eje transversal se puede apreciar que la actividad enzimática es ligeramente superior en las células inferiores de la vellosidad y en las de las criptas.

Las variaciones de actividad enzimática, expresadas en términos de actividad total, se muestran - en la tabla 19 (fig. 14), observándose que la máxima - actividad la presentan las células superiores y medias de la vellosidad.

4.F.4.- Variaciones en la actividad ACAT

Los resultados de la tabla 20 (fig. 15) reflejan las variaciones de la actividad específica ACAT a lo largo del intestino. El yeyuno es la región en la que se alcanzan claramente los valores más elevados, y dentro de esta región, las células superiores y medias de la vellosidad son las que se muestran más activas. En íleon, se observaron los valores más bajos de actividad.

La actividad enzimática, expresada como actividad total, se muestra en la tabla 21 (fig. 16). En ella se aprecia que los valores más elevados corresponden también, en las tres regiones, a las células superiores y medias de la vellosidad.

4.F.5.- Variaciones en la actividad acil-CoA hidrolasa

Actividad específica PPMVA descarboxilasa
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Íleon
VS	30.4 _± 0.1	32.5 _± 4.8	30.0 _± 1.5
VM	29.4 _± 2.3	48.7 _± 1.5	34.0 _± 1.7
VI	37.5 _± 1.8	52.7 _± 1.1	43.4 _± 1.6
C	41.4 _± 5.0	46.8 _± 0.1	52.6 _± 7.0

Tabla 18.- Actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad, VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

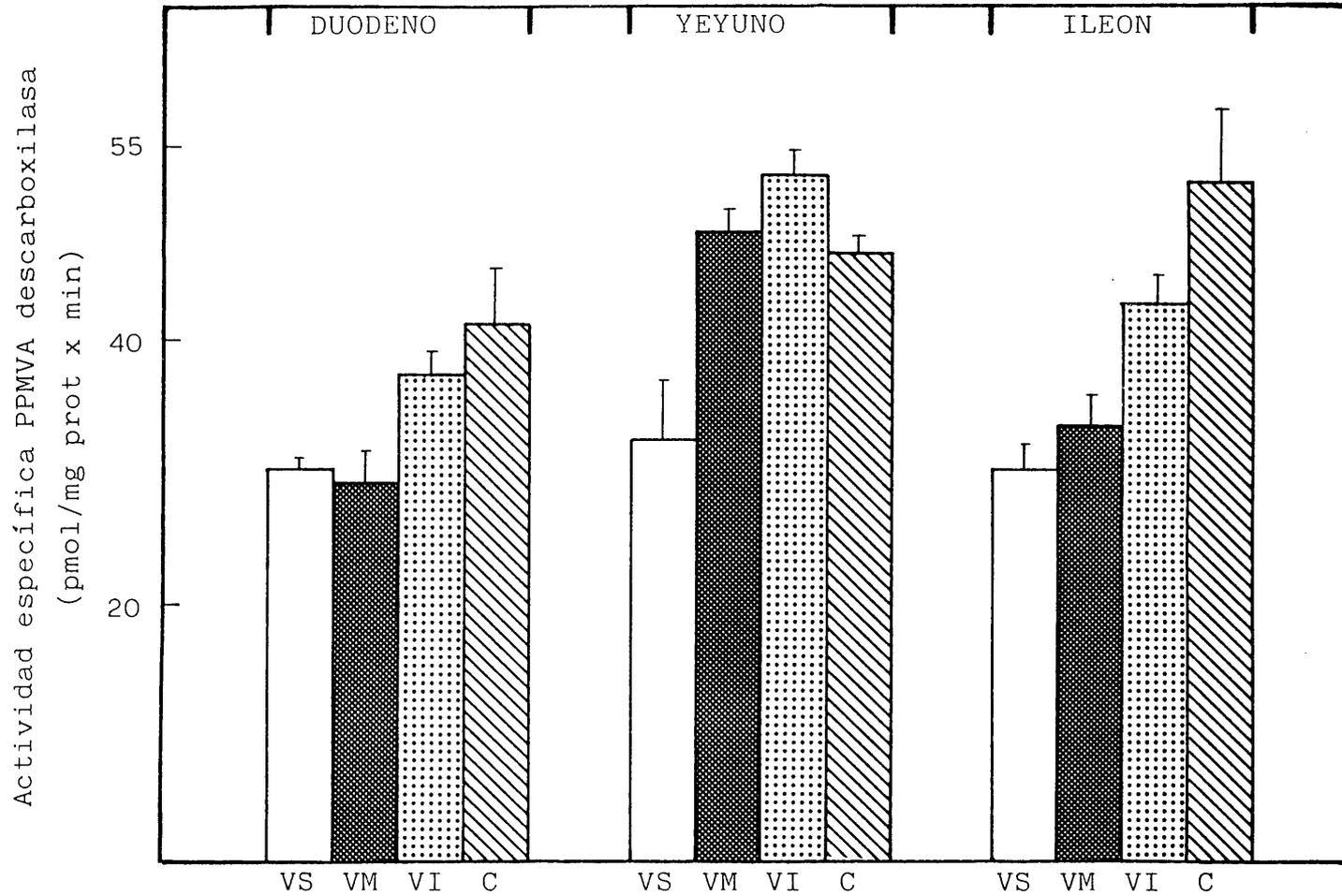


Figura 13.- Actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total PPMVA descarboxilasa
(nmol/min)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	2.71 _± 0.01	0.91 _± 0.13	0.59 _± 0.03
VM	1.71 _± 0.13	1.12 _± 0.03	1.20 _± 0.06
VI	1.27 _± 0.06	0.82 _± 0.02	1.18 _± 0.06
C	1.38 _± 0.16	0.42 _± 0.01	0.52 _± 0.07

Tabla 19.- Actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

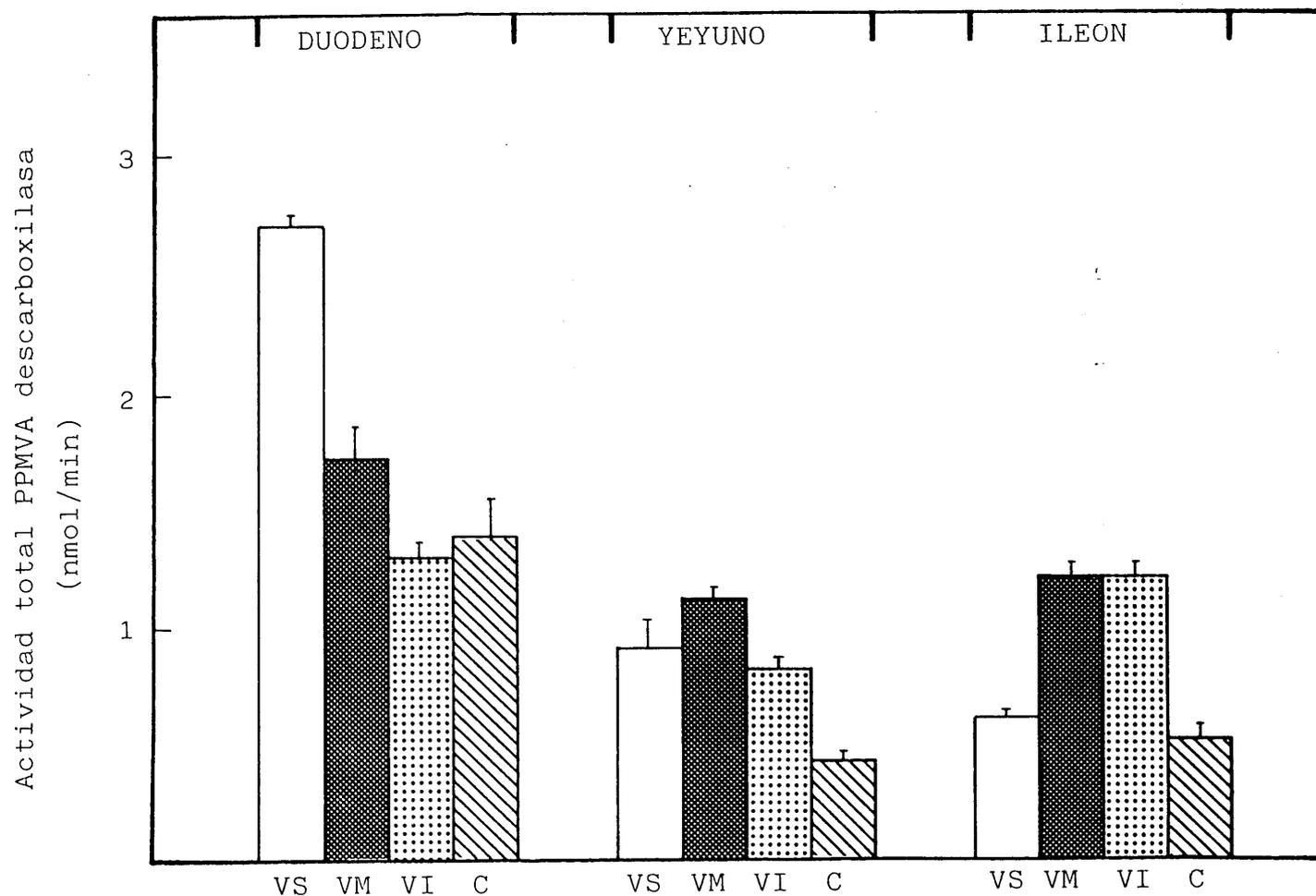


Figura 14.- Actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica ACAT
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	142.8 _± 9.8	342.6 _± 19.3	92.3 _± 3.1
VM	123.5 _± 6.1	350.4 [±] 6.9	87.2 _± 0.3
VI	141.0 _± 3.2	242.4 _± 7.0	99.6 _± 5.1
C	131.5 _± 1.2	241.8 _± 2.1	92.4 _± 2.0

Tabla 20.- Actividad específica ACAT de células apiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

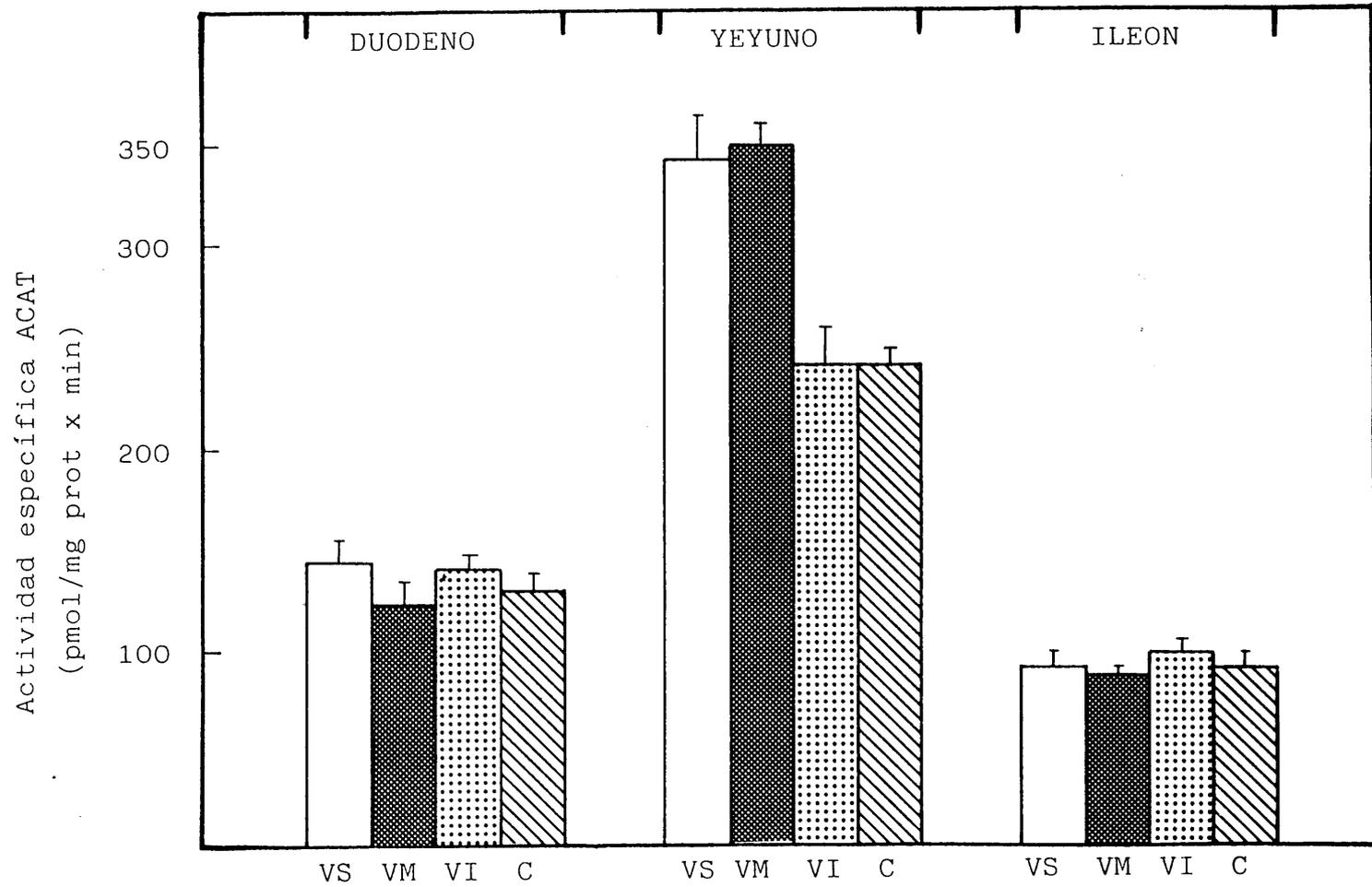


Figura 15.- Actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total ACAT
(nmol/min)

Fracción celular	Duodeno	Yeuno	Ileon
VS	12.71±0.87	9.64±0.54	1.83±0.06
VM	7.19±0.35	8.09±0.16	3.09±0.01
VI	4.79±0.11	3.77±0.11	2.72±0.18
C	4.40±0.04	2.05±0.02	0.92±0.02

Tabla 21. - Actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon: VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.

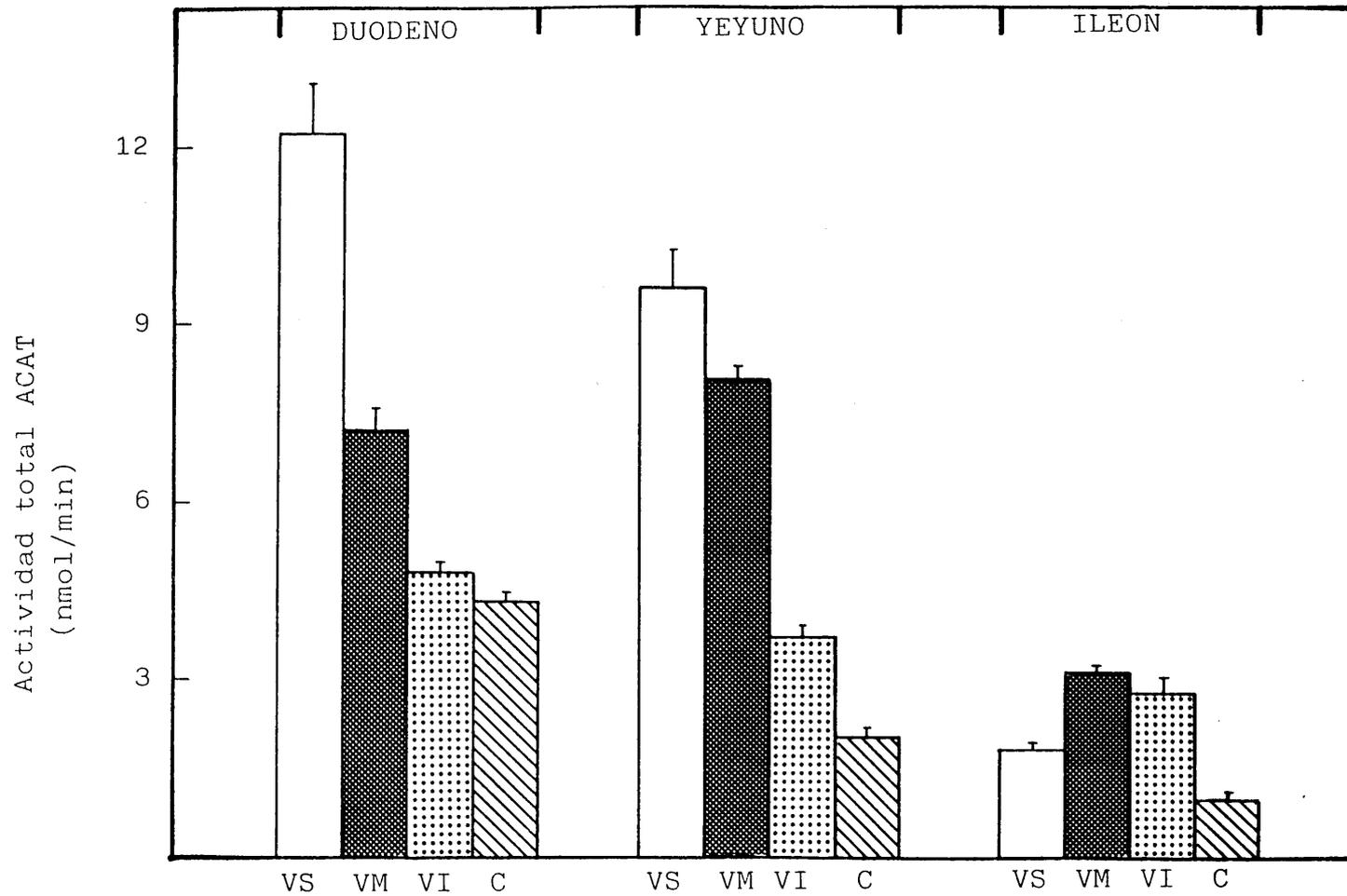


Figura 16.- Actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Con el objeto de conocer el grado de hidrólisis del oleil-CoA, utilizado como sustrato en la reacción de la ACAT y en la incorporación a triglicéridos y fosfolípidos, se determinó la actividad acil-CoA hidrolasa en las distintas fracciones celulares de duodeno, yeyuno e íleon. Los resultados se muestran en la tabla 22 (fig. 17). No se observan diferencias notables entre las tres regiones de estudio, excepto en yeyuno, donde las células superiores y medias de la vellosidad muestran las mayores actividades.

4.F.6.- Variaciones en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.

El yeyuno es la región del intestino que muestra la mayor actividad en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, siendo unas 3 veces superior que en duodeno y alrededor de unas 7 veces superior que en íleon. Los resultados, expresados en nmol/mg prot x min, se muestran en la tabla 23 (fig. 18).

La tasa de incorporación a lo largo del intestino, expresada como nmol/min, se muestra en la tabla 24 (fig. 19), en ella se observa que los valores más elevados corresponden a las células superiores y medias de la vellosidad, en duodeno y yeyuno, y los valores mínimos, a las células inferiores y a las de las criptas de íleon.

4.F.7.- Variaciones en la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.

Los valores obtenidos en la velocidad específica de incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos se muestran en la tabla 25 (fig. 20). En ella se puede apreciar que la máxima actividad se encuentra en las células superiores de la vellosidad de yeyuno, seguida -

Actividad específica acil-CoA hidrolasa
(nmol/min x mg prot)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Íleon
VS	4.2 _± 0.1	6.1 _± 0.2	4.1 _± 0.3
VM	4.6 _± 0.1	6.6 _± 0.1	3.5 _± 0.1
VI	5.2 _± 0.2	4.9 _± 0.1	4.4 _± 0.2
C	4.8 _± 0.1	4.2 _± 0.2	3.0 _± 0.1

Tabla 22.- Actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de - duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; - VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

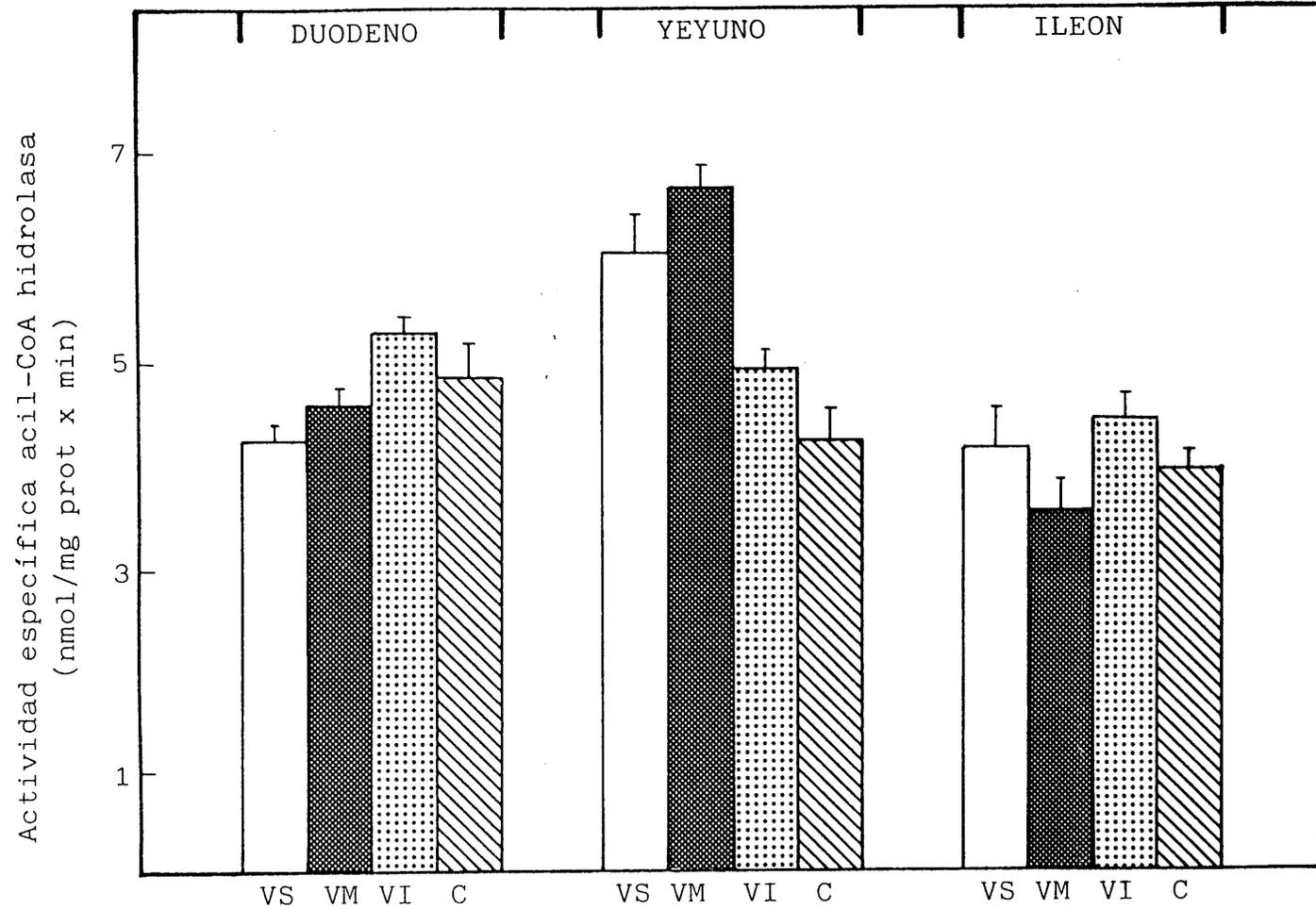


Figura 17.- Actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	288.5 \pm 7.5	823.4 \pm 50.0	125.6 \pm 10.4
VM	234.0 \pm 6.3	722.5 \pm 38.5	103.7 \pm 6.5
VI	289.0 \pm 10.6	600.7 \pm 25.5	92.5 \pm 4.3
C	210.5 \pm 1.5	655.6 \pm 19.3	95.0 \pm 6.1

Tabla 23.- Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

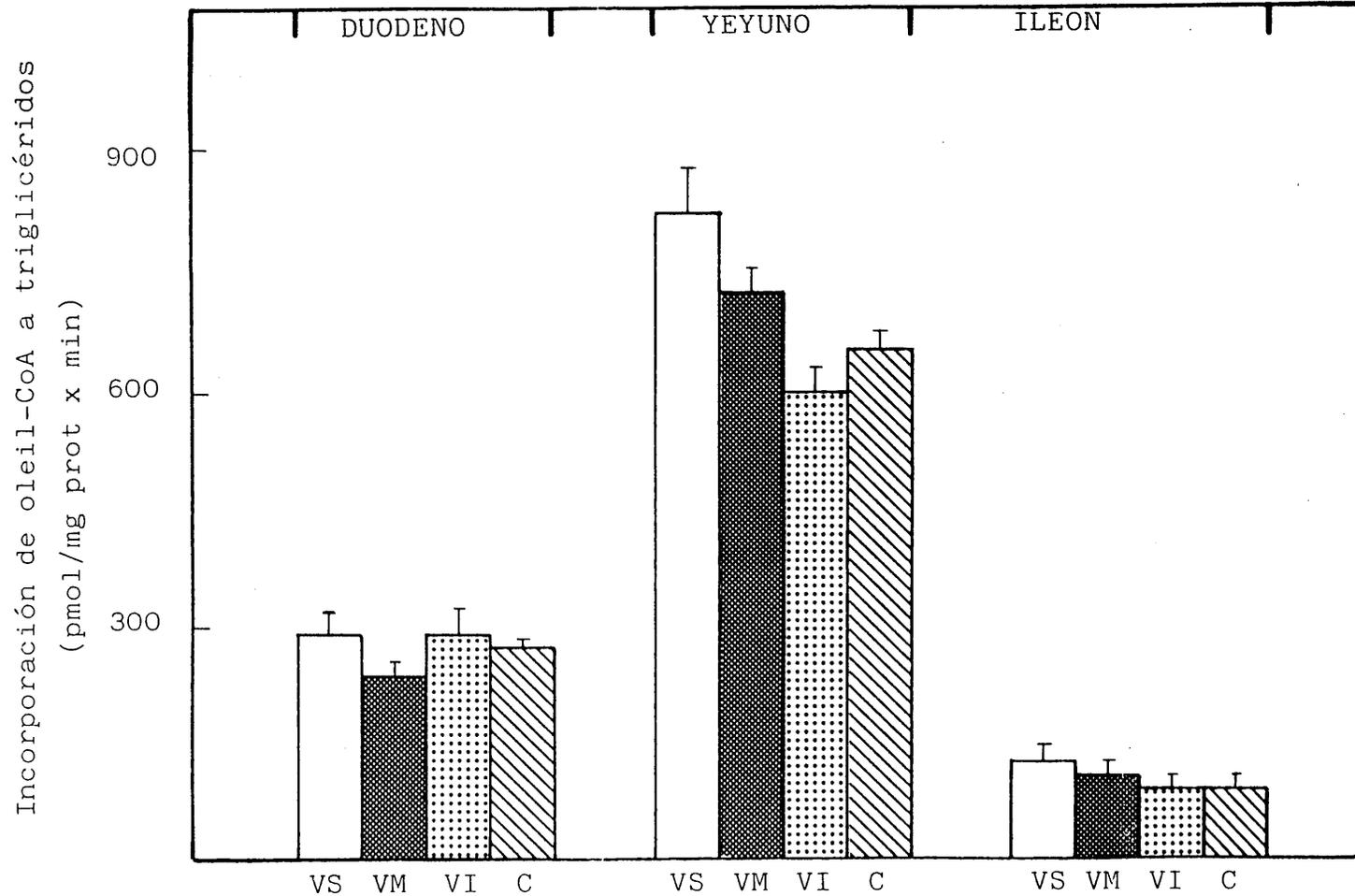


Figura 18.- Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de dudeno, yeyuno e íleon. VS:células superires de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos (nmol/min)			
Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	22.69 _± 0.66	23.17 _± 1.41	2.48 _± 0.21
VM	13.62 _± 0.36	16.67 _± 0.92	3.67 _± 0.20
VI	9.81 _± 0.36	9.34 _± 0.41	2.52 _± 0.23
C	5.70 _± 0.05	5.83 _± 0.27	0.95 _± 0.06

Tabla 24.- Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias, VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

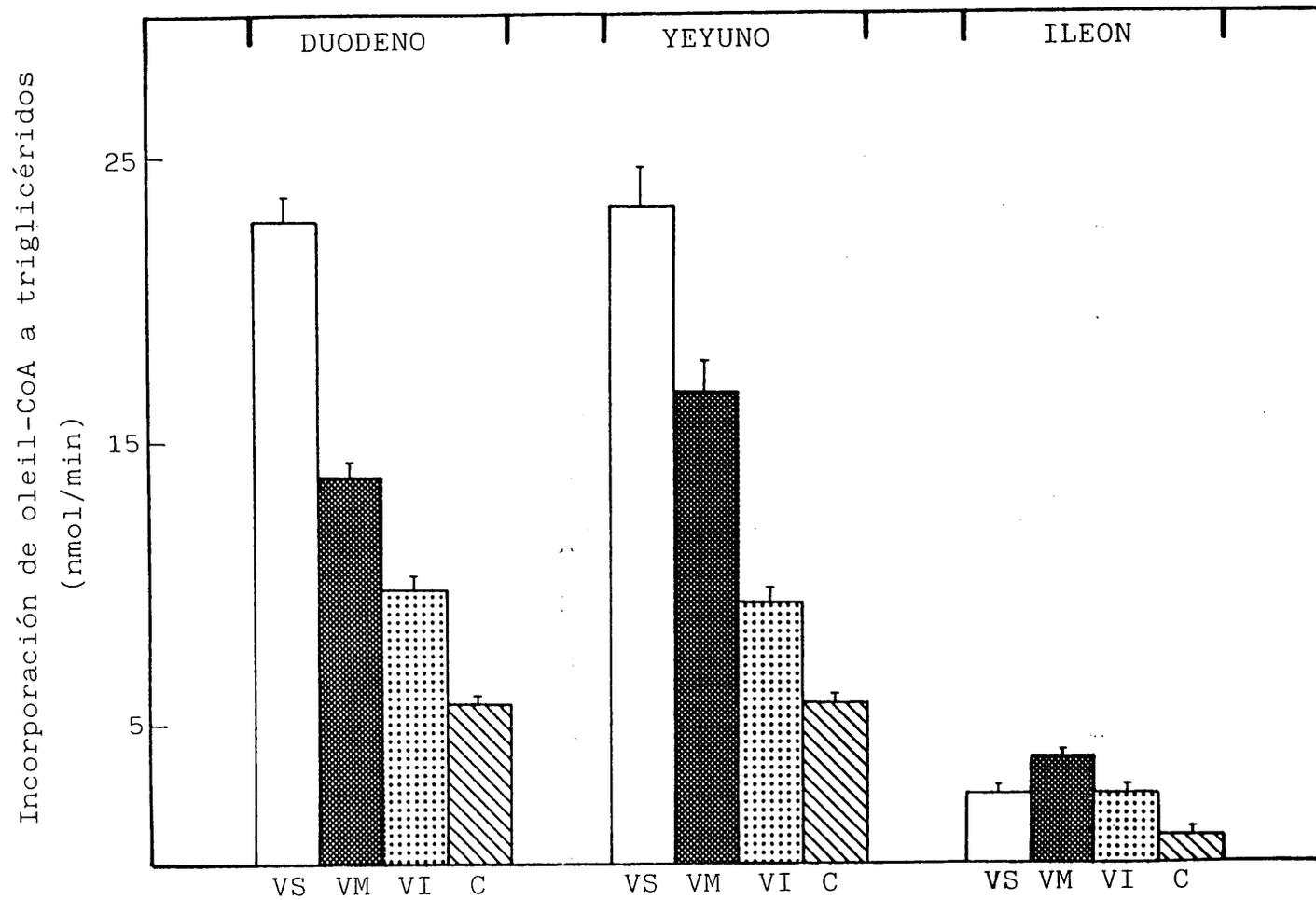


Figura 19.- Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/mg prot x min)

Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	1.53±0.03	5.23±0.28	1.04±0.08
VM	1.14±0.05	3.15±0.02	0.99±0.20
VI	1.45±0.07	1.47±0.05	1.04±0.05
C	1.22±0.02	0.96±0.08	1.12±0.02

Tabla 25.- Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.

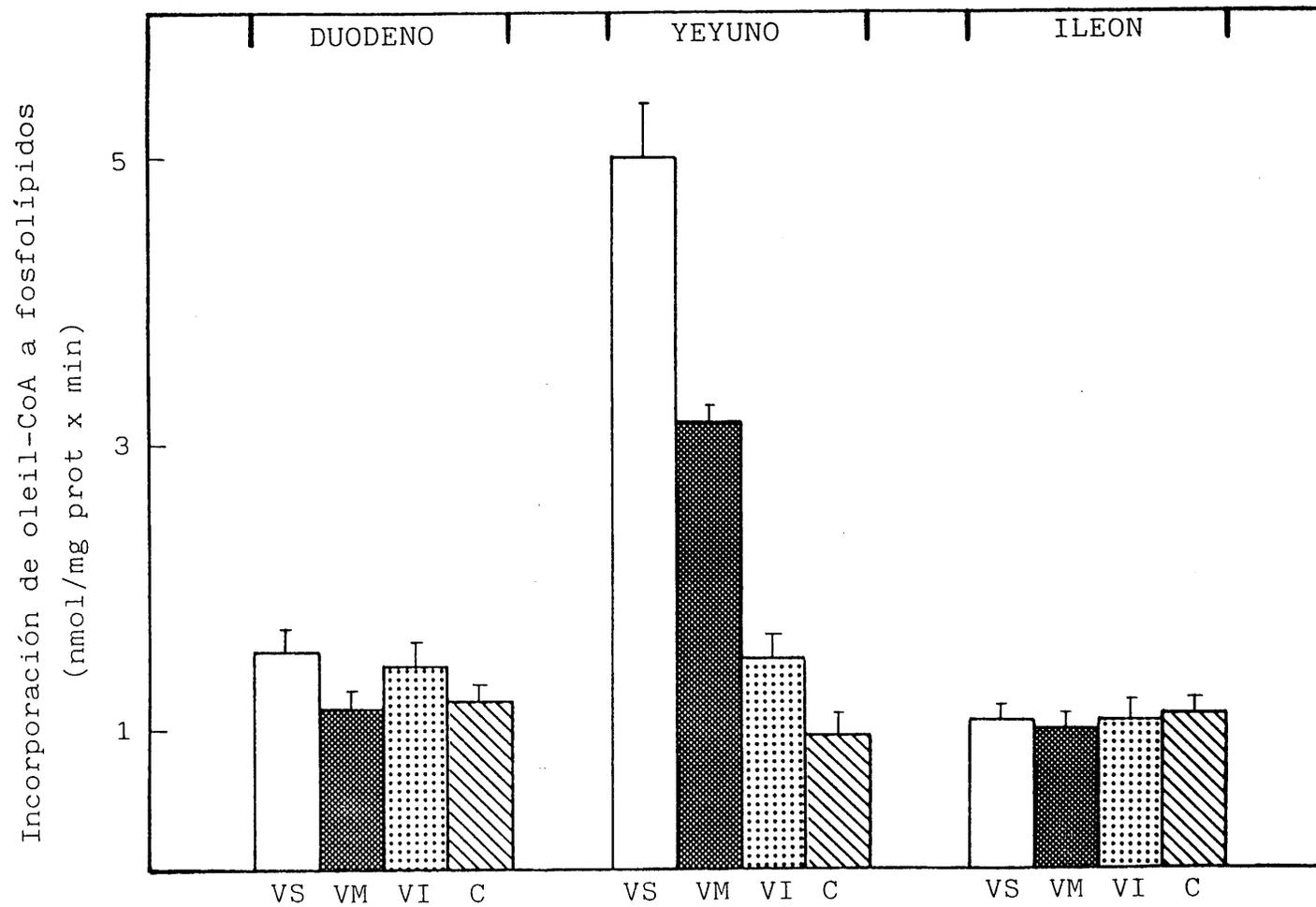


Figura 20.- Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos (nmol/min)			
Fracción celular	Duodeno	Yeyuno	Ileon
VS	136.1 \pm 2.5	147.3 \pm 7.9	20.7 \pm 1.5
VM	66.5 \pm 2.9	72.7 \pm 0.6	35.3 \pm 0.6
VI	49.2 \pm 2.4	22.8 \pm 0.7	28.4 \pm 3.7
C	40.7 \pm 0.8	8.5 \pm 0.7	11.2 \pm 0.2

Tabla 26.- Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

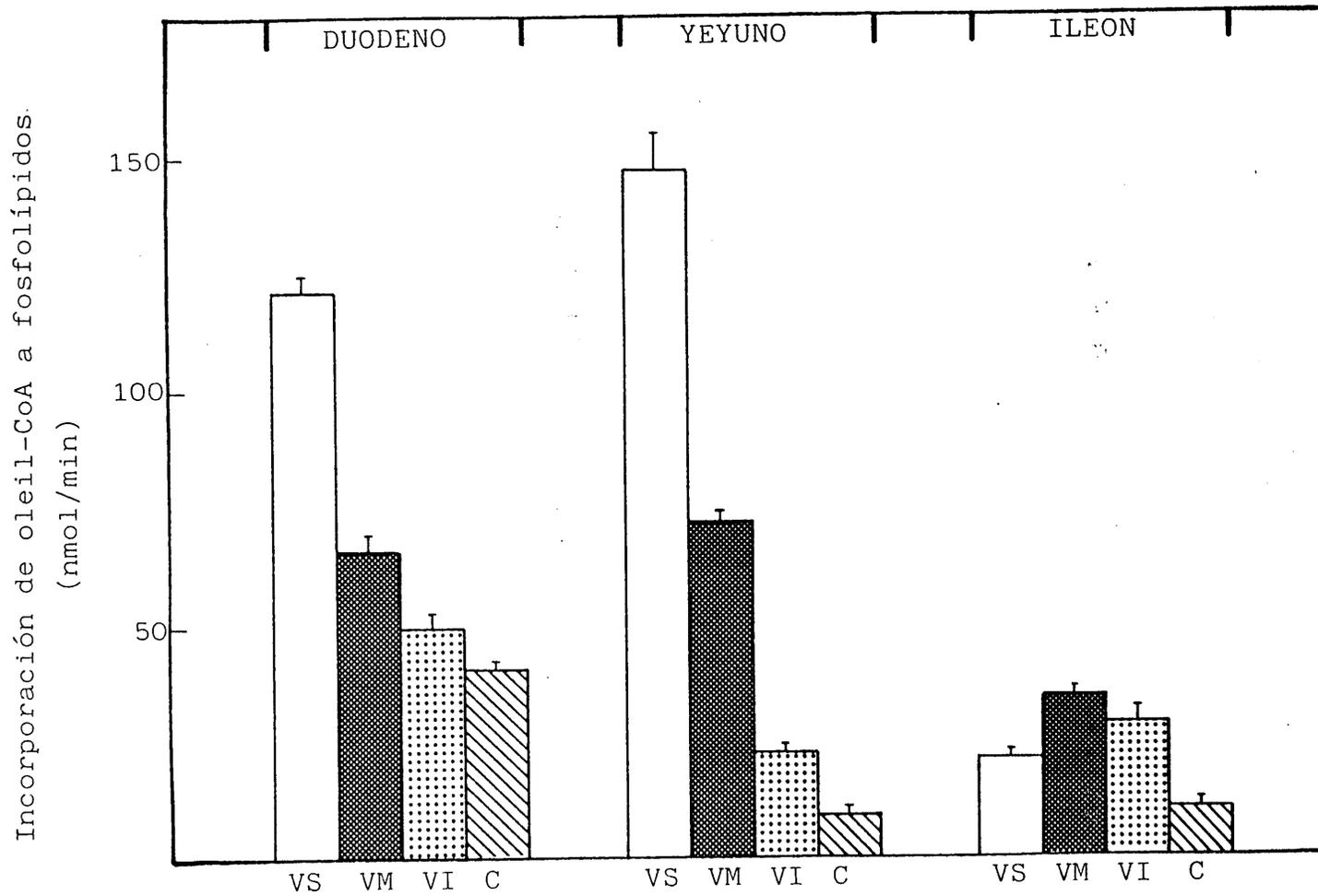


Figura 21.- Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

de la de las células medias de la misma región.

Las notables diferencias de actividad en yeyuno, entre las células superiores de la vellosidad y las de las criptas, no se aprecian ni en duodeno ni en íleon, donde las actividades son sensiblemente inferiores.

La tasa de incorporación, expresada como nmol/min, se refleja en la tabla 26 (fig. 21). En ella se observa que las células superiores de la vellosidad de duodeno y yeyuno presentan la máxima actividad; siendo 4 y 15 veces superior, respectivamente, que la determinada en las células de las criptas. En cambio en íleon, la máxima actividad corresponde a las células medias de la vellosidad no apreciándose en esta región las notables diferencias que entre las distintas fracciones se observan en duodeno y yeyuno.

4.G.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre el metabolismo lipídico en duodeno.

Con el objeto de establecer en duodeno, las posibles modificaciones de la actividad colesterogénica y lipogénica, producidas por la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, se procedió a la determinación del contenido en colesterol, así como de distintas actividades enzimáticas, en células superiores de la vellosidad, células medias, inferiores y células de las criptas.

Los distintos ensayos se realizaron en un "pool" de células procedentes de tres pollos distintos.

4.G.1.- Efecto sobre el contenido en colesterol.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 27 (fig. 22). En ella se puede observar que no se aprecian diferencias notables entre los controles y los pollos alimentados con una dieta suplementada con colestiramina. Sin embargo, en la dieta suplementada con colesterol, el contenido tanto en colesterol total como libre, es más elevado, y a diferencia de los no tratados o los tratados con colestiramina, el colesterol libre representa alrededor del 70% del total, frente al 90% que representa en los controles o en los tratados con colestiramina.

4.G.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

El efecto activador de la colestiramina, y el inhibidor del colesterol, sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa, se muestra en la tabla 28 (fig. 23). En ella se puede apreciar que los valores de la actividad HMG-CoA reductasa de duodeno, en pollos alimentados con una dieta suplementada con colestiramina, es alrededor de 3 veces superior a la de los controles. En cambio en los alimentados con una dieta suplementada con colesterol, se reduce alrededor del 50%.

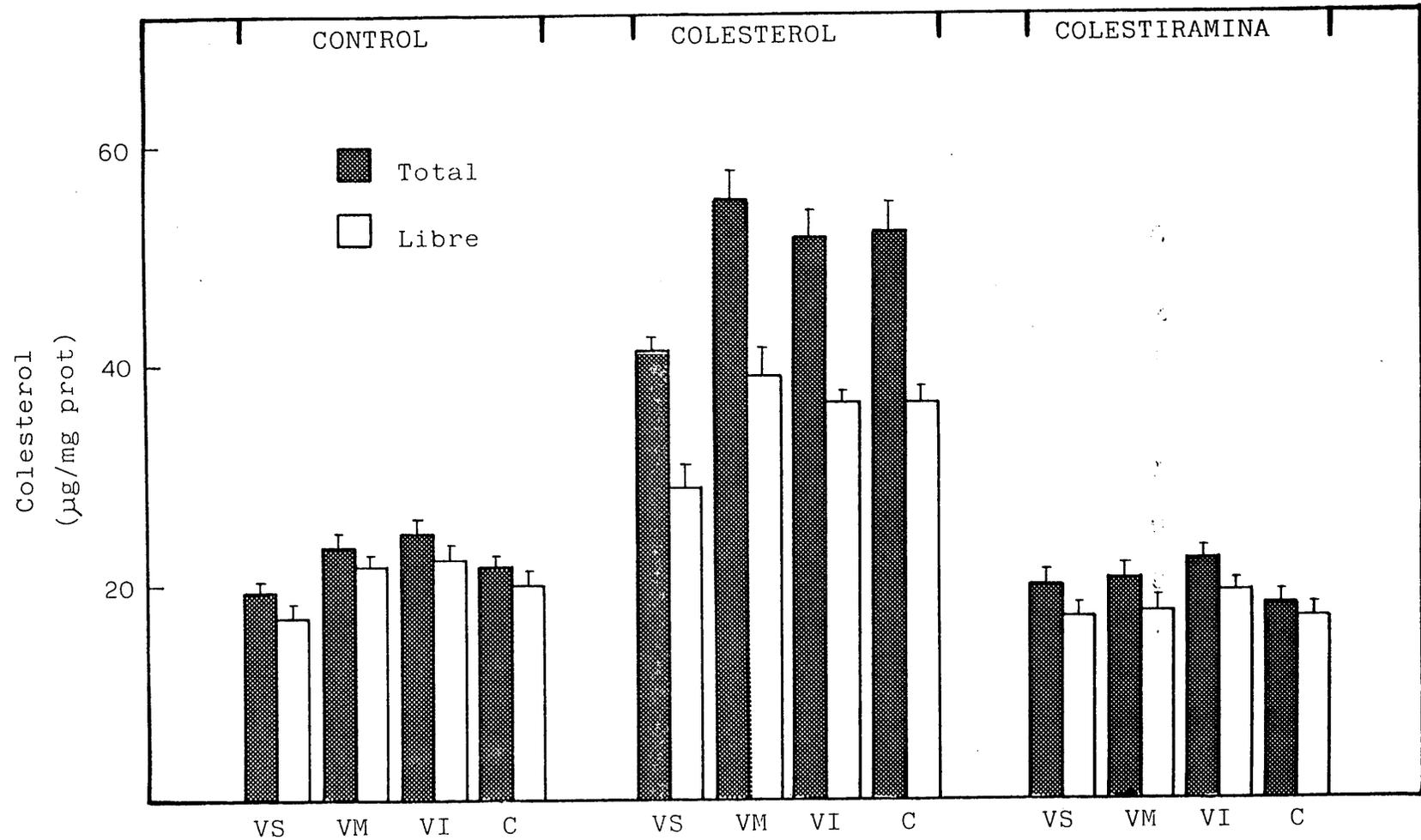
En la tabla 29 (fig. 24) se muestran los valores de la actividad total HMG-CoA reductasa. En ella se puede apreciar que en los pollos tratados con colestiramina, la actividad es más elevada, en cualquiera de las cuatro fracciones estudiadas, que en los pollos controles o en los alimentados con dieta de colesterol.

4.G.3. Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa

Fracción celular	Control		Colesterol		Colestiramina	
	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>
VS	19.4 \pm 0.2	16.7 \pm 0.2	41.2 \pm 0.2	29.1 \pm 1.6	19.7 \pm 0.7	16.6 \pm 0.4
VM	23.2 \pm 0.7	21.5 \pm 0.5	55.4 \pm 2.0	39.1 \pm 2.3	20.6 \pm 0.9	17.5 \pm 0.8
VI	24.8 \pm 0.8	22.1 \pm 1.1	51.6 \pm 2.3	36.6 \pm 0.1	22.0 \pm 0.6	19.5 \pm 0.3
C	21.5 \pm 0.1	19.9 \pm 0.5	52.2 \pm 2.1	36.7 \pm 0.5	21.1 \pm 0.9	20.0 \pm 1.7

Tabla 27.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno de pollos alimentados con dieta control o suplementada con colesterol o colestiramina. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

DUODENO



-197-

Figura 22.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno, de pollos alimentados con una dieta control o suplementada con colesterol o colestiramina. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica HMG-CoA reductasa
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	75.4 \pm 4.1	49.8 \pm 3.5**	322.2 \pm 3.9 ***
VM	74.3 \pm 1.5	48.5 \pm 3.3**	354.2 \pm 16.6***
VI	96.2 \pm 5.0	46.2 \pm 1.7***	336.9 \pm 7.8 ***
C	109.5 \pm 5.4	48.6 \pm 5.8**	272.6 \pm 9.0 ***

Tabla 28.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: Células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como las medias de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles: (*)p<0.05; (**)p<0.01; (***)p<0.001.

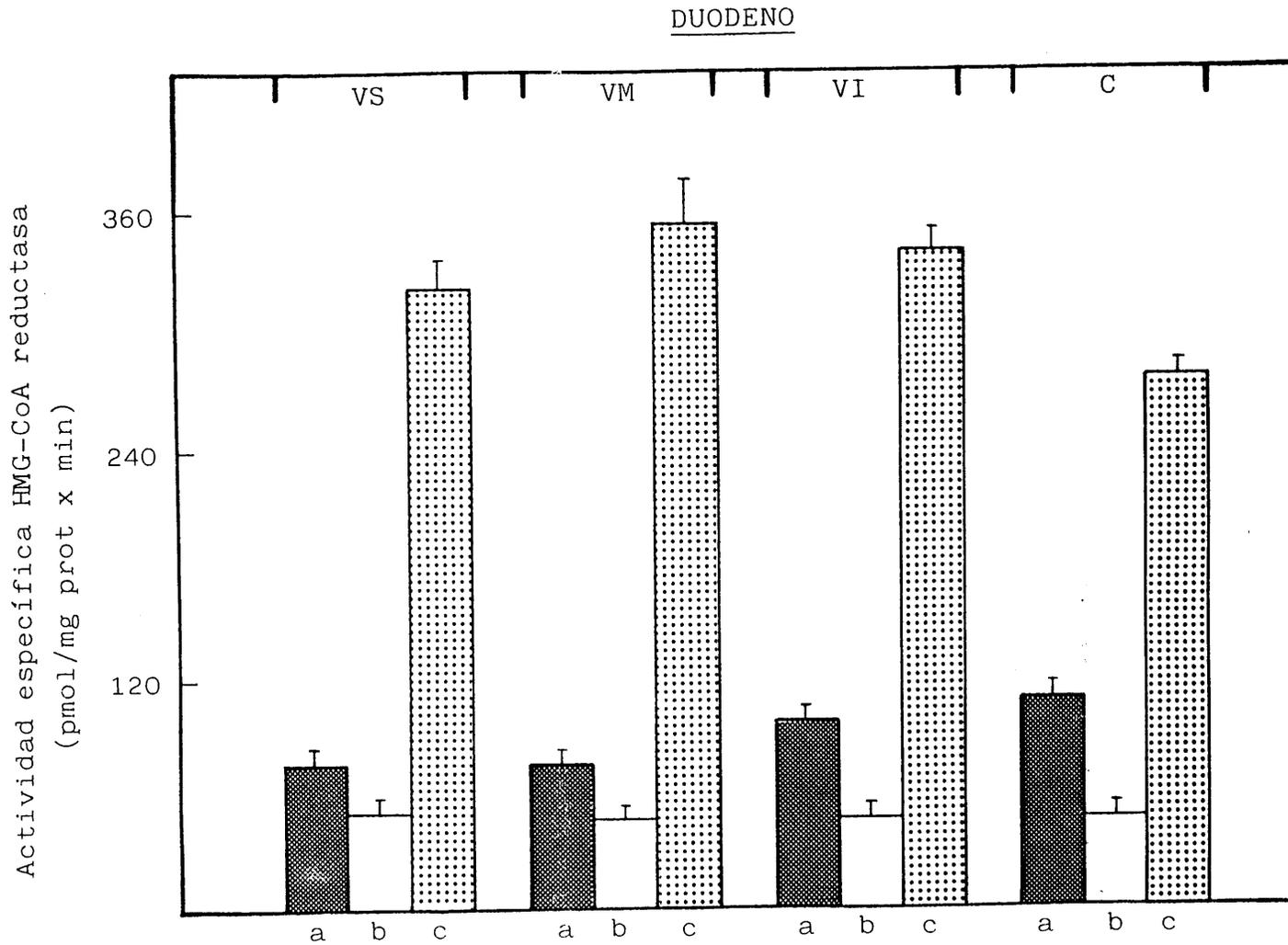


Figura 23.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI: células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm SEM

Actividad total HMG-CoA reductasa
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	4.43 \pm 0.24	3.42 \pm 0.24	17.14 \pm 0.21
VM	3.33 \pm 0.07	3.29 \pm 0.22	15.56 \pm 0.73
VI	2.98 \pm 0.15	2.57 \pm 0.10	13.36 \pm 0.31
C	2.52 \pm 0.12	1.92 \pm 0.22	7.63 \pm 0.25

Tabla 29.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno.- VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

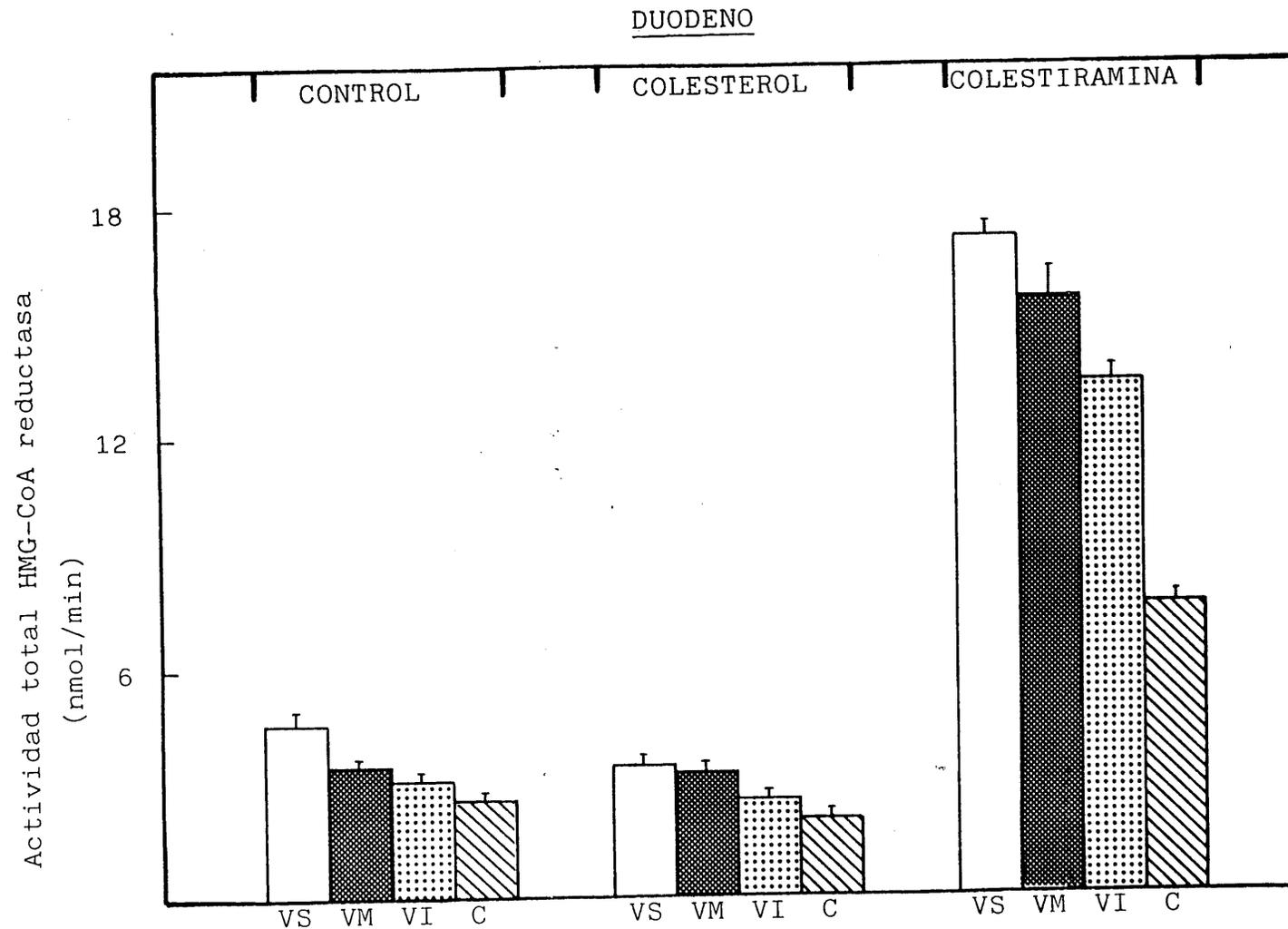


Figura 24.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores; C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica PPMVA descarboxilasa (pmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	52.6 \pm 0.8	51.1 \pm 3.2	169.0 \pm 5.7 ***
VM	84.8 \pm 1.3	53.2 \pm 1.0***	170.7 \pm 6.4 ***
VI	118.8 \pm 2.2	61.6 \pm 4.4***	203.9 \pm 10.0***
C	136.0 \pm 0.8	72.4 \pm 3.0***	224.6 \pm 15.0***

Tabla 30.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

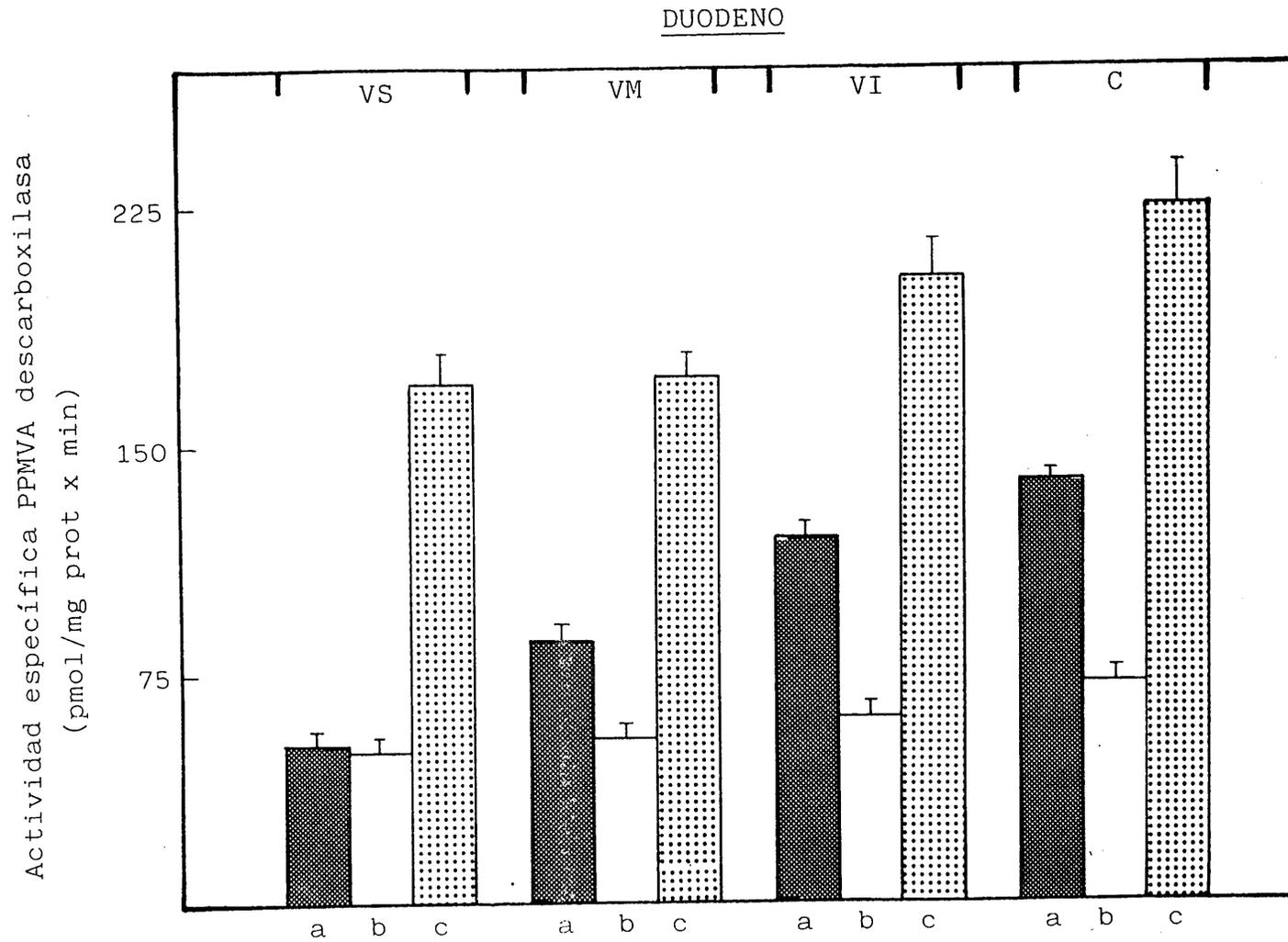


Figura 25.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica PPMVA dsecarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a) control, (b) colesterol, (c) colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total PPMVA descarboxilasa
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	3.09 _± 0.05	3.51 _± 0.22	8.99 _± 0.30
VM	3.81 _± 0.05	3.61 _± 0.07	7.50 _± 0.29
VI	3.68 _± 0.07	3.43 _± 0.24	8.08 _± 0.39
C	3.13 _± 0.02	2.86 _± 0.12	6.29 _± 0.42

Tabla 31.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

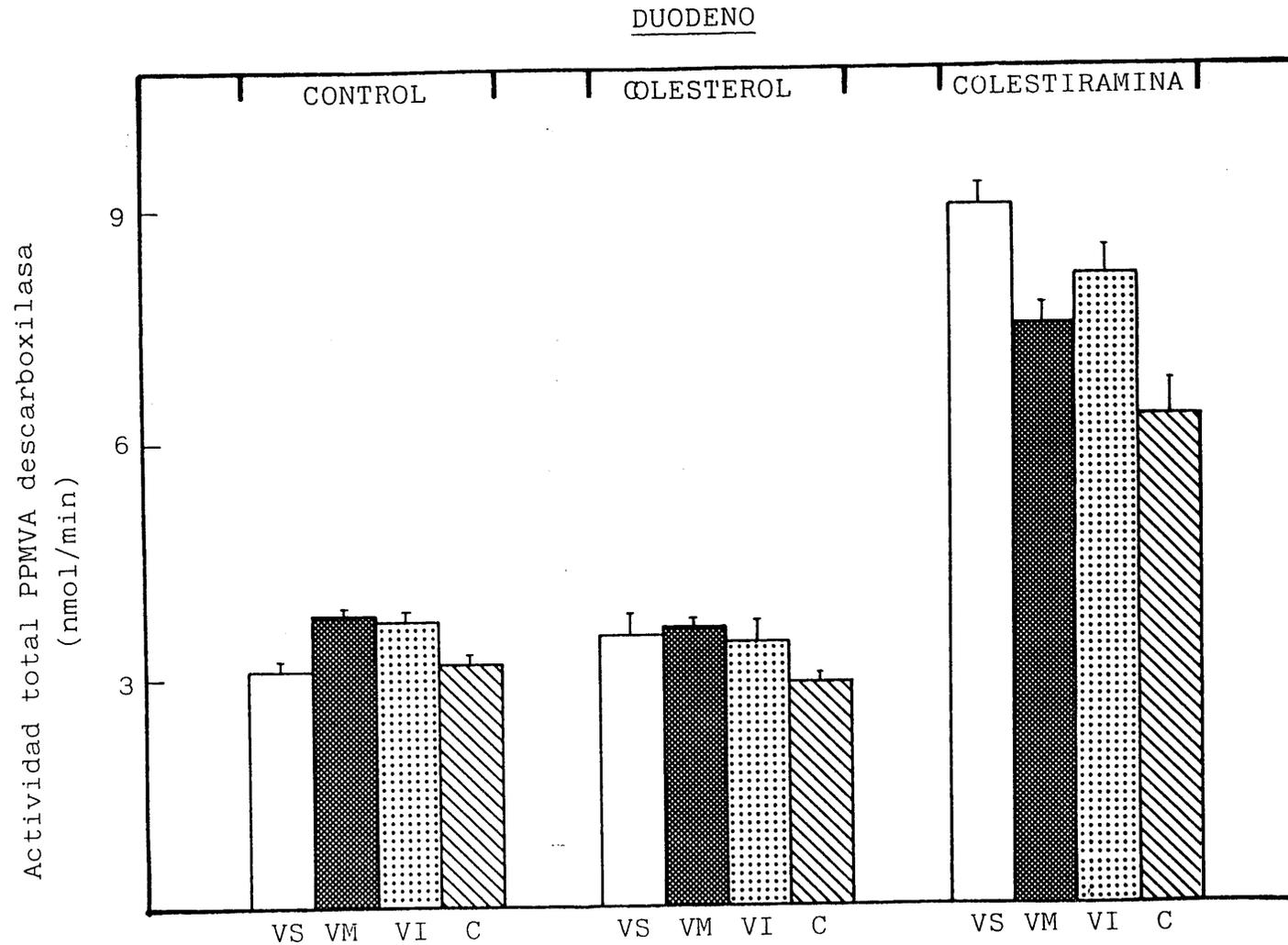


Figura 26.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

La tabla 30 (fig 25), refleja los valores de actividad específica PPMVA descarboxilasa obtenidos - tras la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina frente a los valores obtenidos con una dieta control. Se puede apreciar que la actividad es 2-3 veces superior en los pollos alimentados con colestiramina, respecto a los alimentados con una dieta control, en tanto que en los alimentados con una dieta con colesterol las actividades representan entre el 90 y el 50% de las determinadas en condiciones control.

Respecto de las diferencias entre las distintas fracciones de la vellosidad, se observa un incremento de actividad en el sentido células superiores de la vellosidad - criptas.

En la tabla 31 (fig. 26) se muestran los valores de actividad PPMVA descarboxilasa, expresados en términos de actividad total. Igual que en el caso de la HMG-CoA reductasa, se observa que los valores más elevados se determinaron en pollos alimentados con dietas suplementadas con colestiramina.

4.G.4.- Efecto sobre la actividad ACAT.

Los resultados obtenidos, expresados en términos de actividad específica, se reflejan en la tabla 32 (fig. 27). Como se puede apreciar, el colesterol de la dieta activa la ACAT en cada una de las fracciones celulares estudiadas, mostrándose un gradiente de activación descendente en el sentido células superiores - criptas. En cambio, en las dietas suplementadas con colestiramina, la actividad ACAT desciende ligeramente respecto de los valores obtenidos con dietas control.

Fracción celular	Actividad específica ACAT (pmol/min x mg prot)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	164.9 \pm 6.0	650.2 \pm 5.0 ***	119.1 \pm 3.8**
VM	188.2 \pm 1.7	598.8 \pm 54.2***	154.4 \pm 1.8*
VI	237.5 \pm 1.3	535.1 \pm 1.9 ***	136.4 \pm 1.0***
C	271.2 \pm 1.6	392.4 \pm 9.7 ***	107.8 \pm 2.8***

Tabla 32.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles: (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

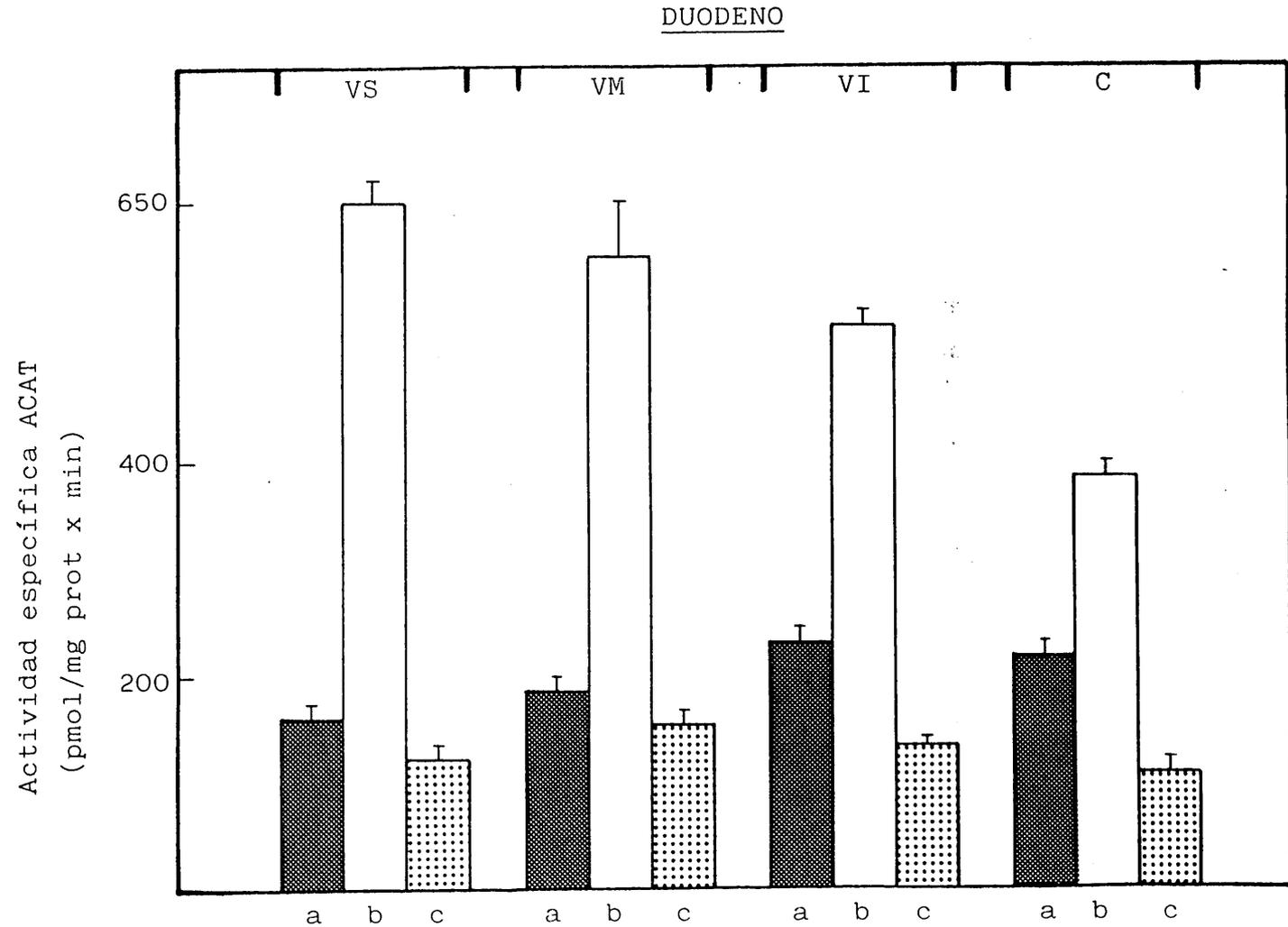


Figura 27.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a) control, (b) colesterol, (c) colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Fracción celular	Actividad total ACAT (nmol/min)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	9.68 \pm 0.35	44.64 \pm 0.40	6.34 \pm 0.20
VM	8.47 \pm 0.34	40.61 \pm 3.67	6.78 \pm 0.08
VI	7.36 \pm 0.04	29.79 \pm 0.11	5.41 \pm 0.04
C	5.09 \pm 0.03	15.51 \pm 0.38	3.02 \pm 0.08

Tabla 33.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

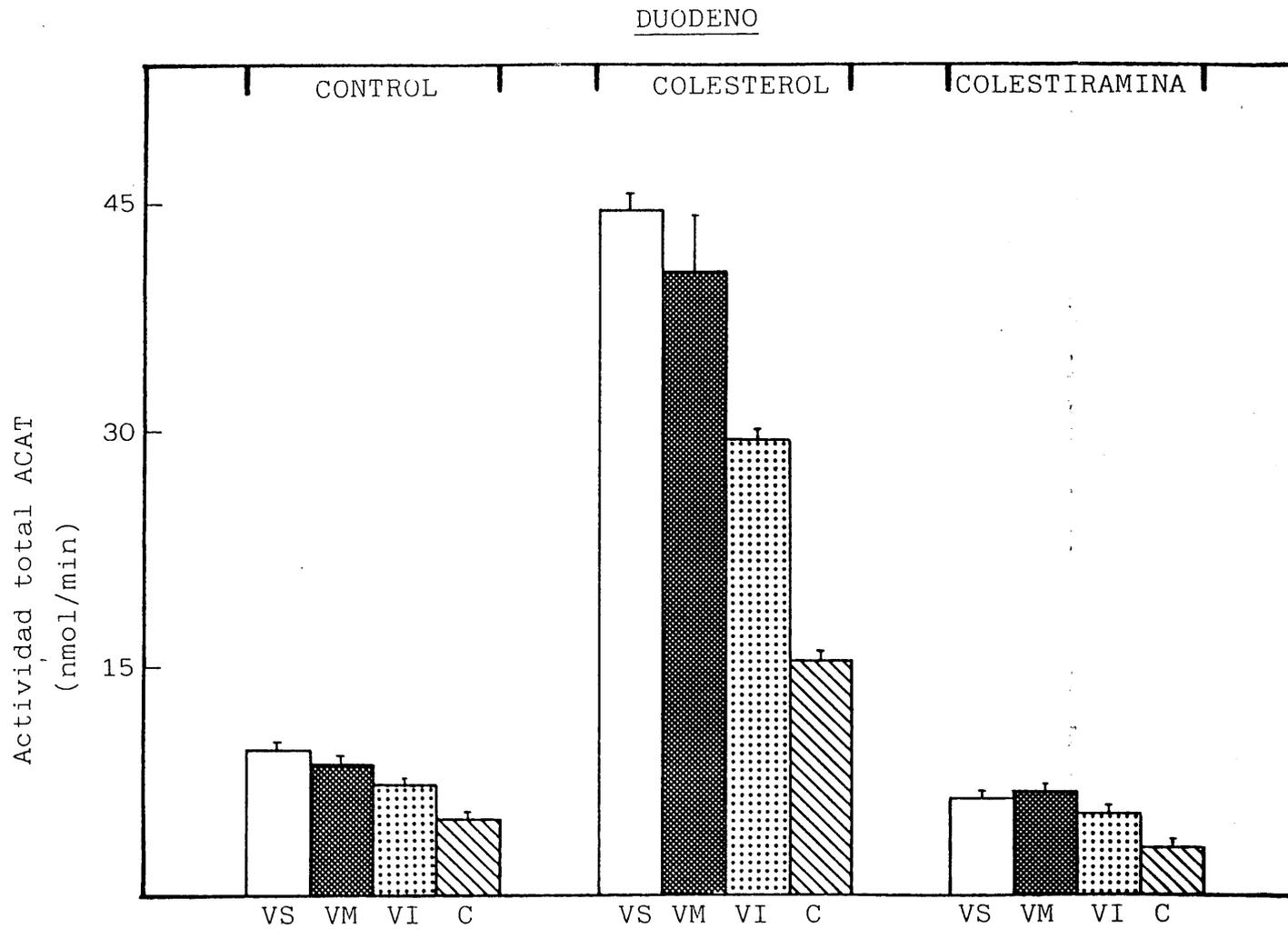


Figura 28.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vello-sidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

En la tabla 33 (fig. 28) se muestran los valores de la actividad ACAT, expresados en términos de actividad total. Los valores mas elevados se determinaron en pollos con dieta suplementada con colesterol.

4.G.5.- Efecto sobre la actividad acil-CoA hidrolasa.

Con el objeto de determinar si la hidrólisis del oleil-CoA se afectaba por la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, se ensayó la actividad acil-CoA hidrolasa. Como se muestra en la tabla 34 (fig. 29), las diferencias no son significativas.

4.G.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-Coa a triglicéridos.

Los valores obtenidos en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 35 (fig. 30). Se puede apreciar un descenso de la actividad, cuando la dieta fué suplementada con colesterol, pero cuando se suplementó con colestiramina, los valores de terminados fueron similares a los controles.

En la tabla 36 (fig. 31), se muestra la incorporación de oleil-Coa a triglicéridos, expresada en términos de actividad total. Tanto en las condiciones control, como cuando la dieta fué suplementada con colesterol o colestiramina, la actividad total fué equivalente en los tres casos, apreciándose en cada uno de ellos que la actividad descendía gradualmente en el sentido células superiores de la vellosidad - criptas.

4.G.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.

Actividad específica acil-CoA hidrolasa
(nmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	8.04 \pm 0.42	7.24 \pm 0.67	9.10 \pm 0.26
VM	8.37 \pm 0.04	7.64 \pm 0.70	9.96 \pm 0.27
VI	9.82 \pm 0.22	8.30 \pm 0.76	9.51 \pm 0.52
C	10.28 \pm 0.07	8.22 \pm 0.81	10.18 \pm 0.31

Tabla 34.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (*)p<0.05.

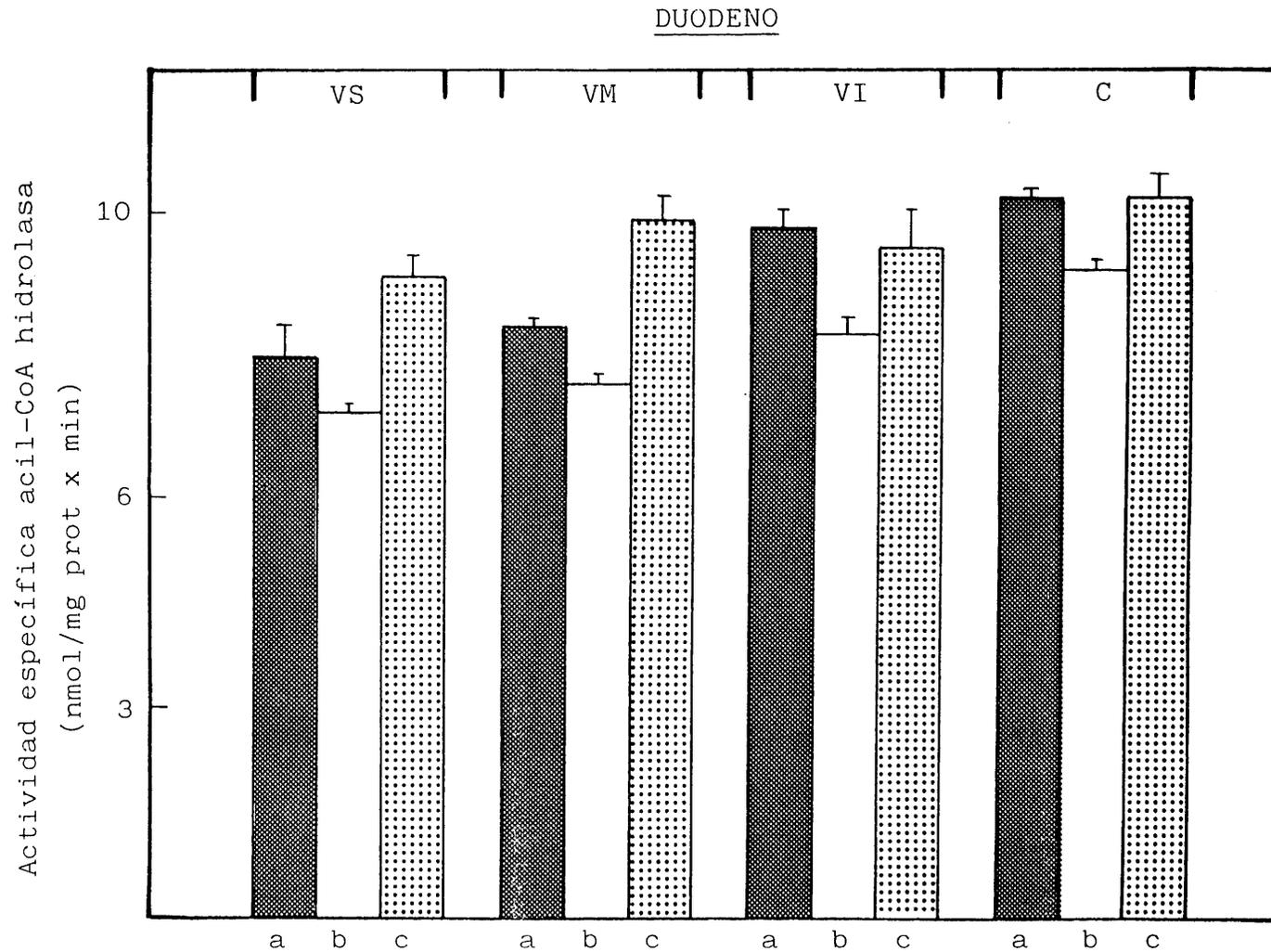


Figura 29.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	537 ₋ 13	497 ₋ 11	584 ₋ 25
VM	538 ₋ 9	484 ₋ 9 *	567 ₋ 16
VI	540 ₋ 9	390 ₋ 10***	535 ₋ 22
C	543 ₋ 10	369 ₋ 5 ***	474 ₋ 16

Tabla 35.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

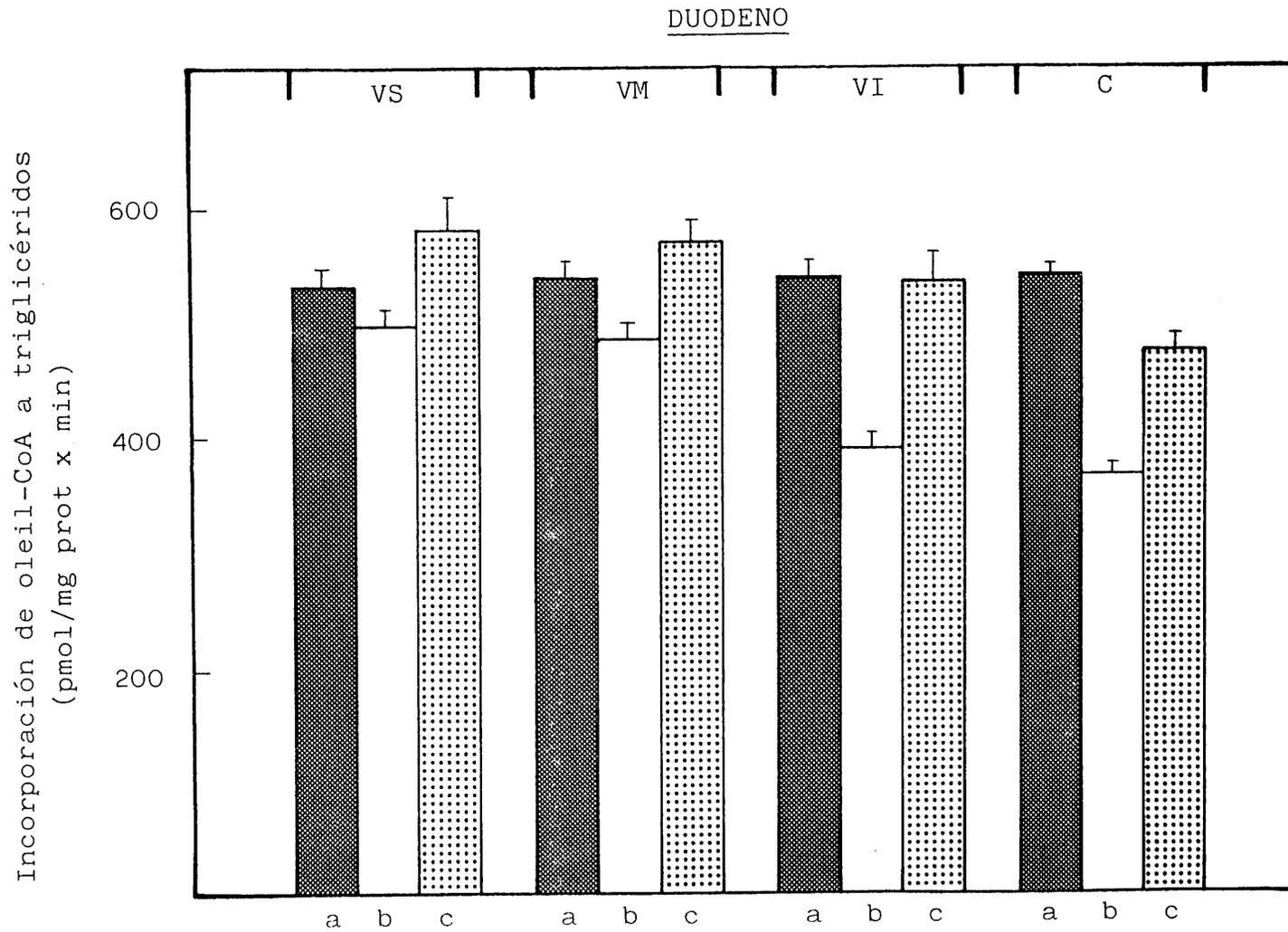


Figura 30.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	31.54 \pm 0.76	34.12 \pm 0.75	35.07 \pm 1.33
VM	24.21 \pm 0.40	32.82 \pm 0.61	24.92 \pm 0.70
VI	16.74 \pm 0.28	21.71 \pm 0.55	21.21 \pm 0.87
C	12.50 \pm 0.02	14.58 \pm 0.20	13.27 \pm 0.17

Tabla 36. - Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, - sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos expresada en términos de actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como media de tres determinaciones \pm S.E.M.

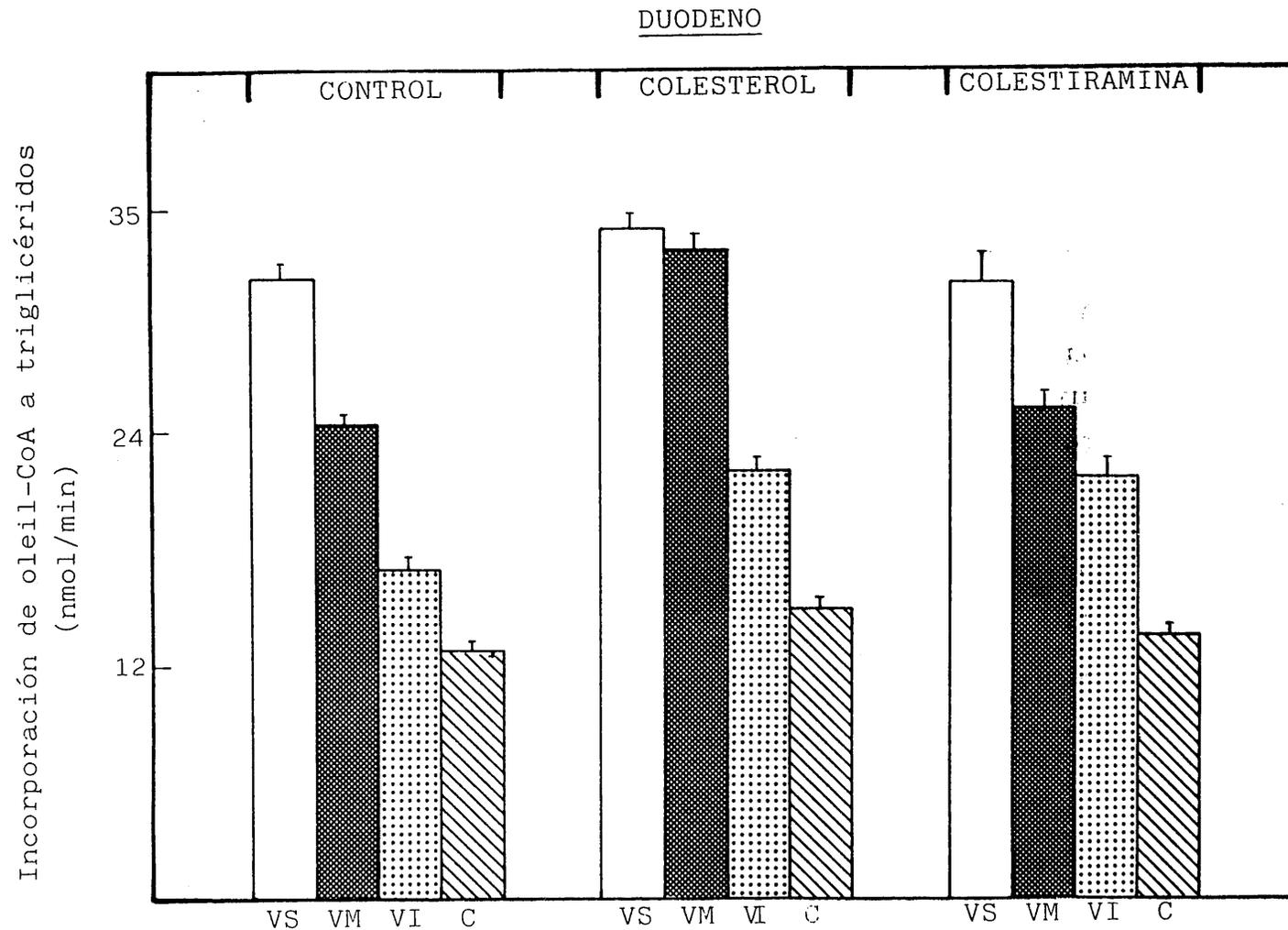


Figura 31.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de dudeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	1.92±0.03	2.31±0.01*	2.19±0.08
VM	1.61±0.02	2.19±0.06*	2.01±0.08*
VI	1.74±0.09	1.80±0.06	1.89±0.05
C	1.79±0.05	1.58±0.03*	1.78±0.05

Tabla 37.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. - Los valores se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (*)p<0.05.

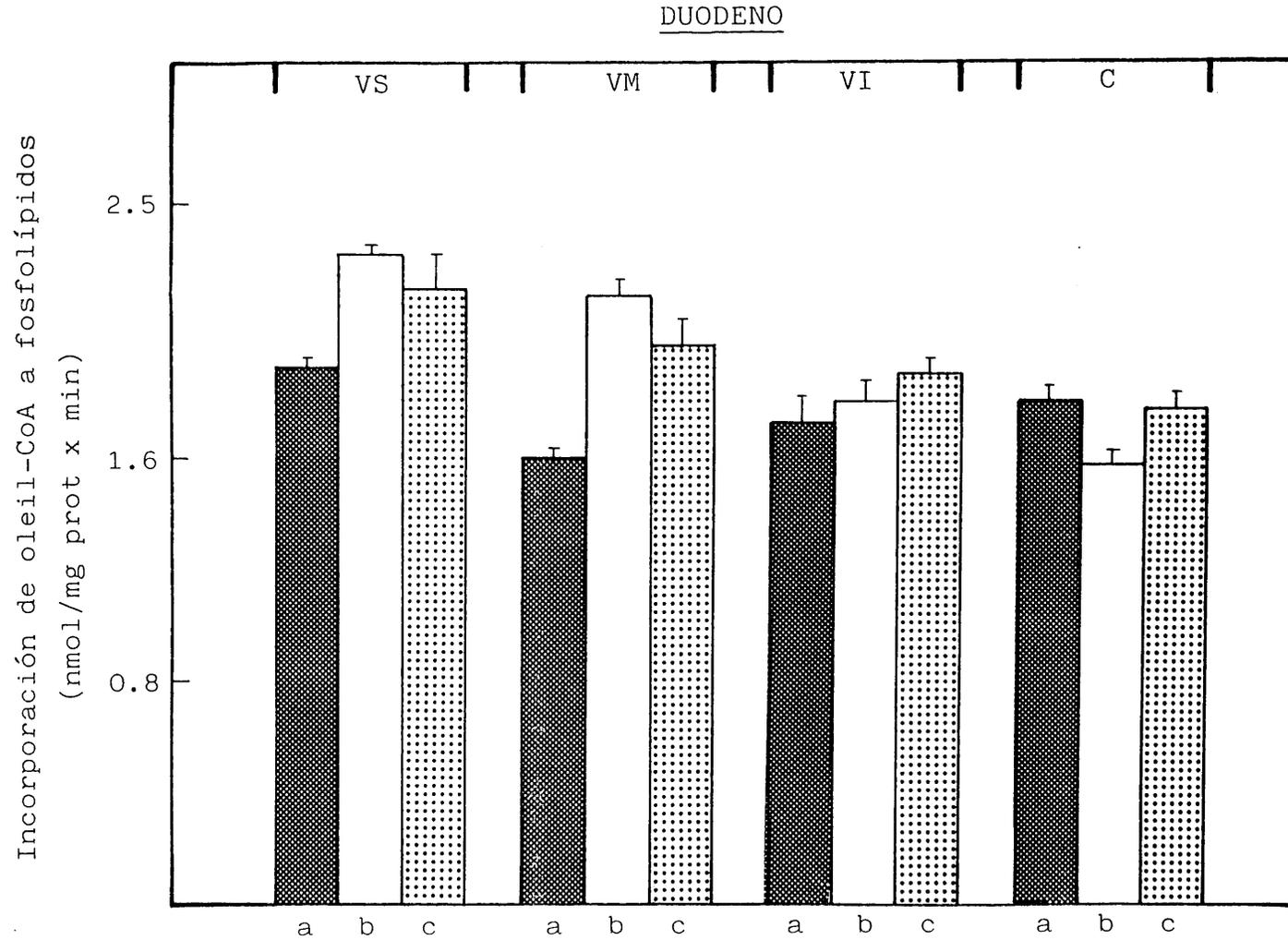


Figura 32.- Efecto de la suplementación de la dieta con clesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA fosfolípidos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI: células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de Oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	112.85 _± 1.64	159.02 _± 0.82	116.52 _± 4.52
VM	72.49 _± 0.99	148.32 _± 3.93	88.38 _± 3.69
VI	53.88 _± 2.72	100.17 _± 3.40	75.17 _± 2.14
C	41.27 _± 1.22	62.52 _± 1.03	49.83 _± 1.34

Tabla 38.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS: células superiores de la vellosidad;- VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

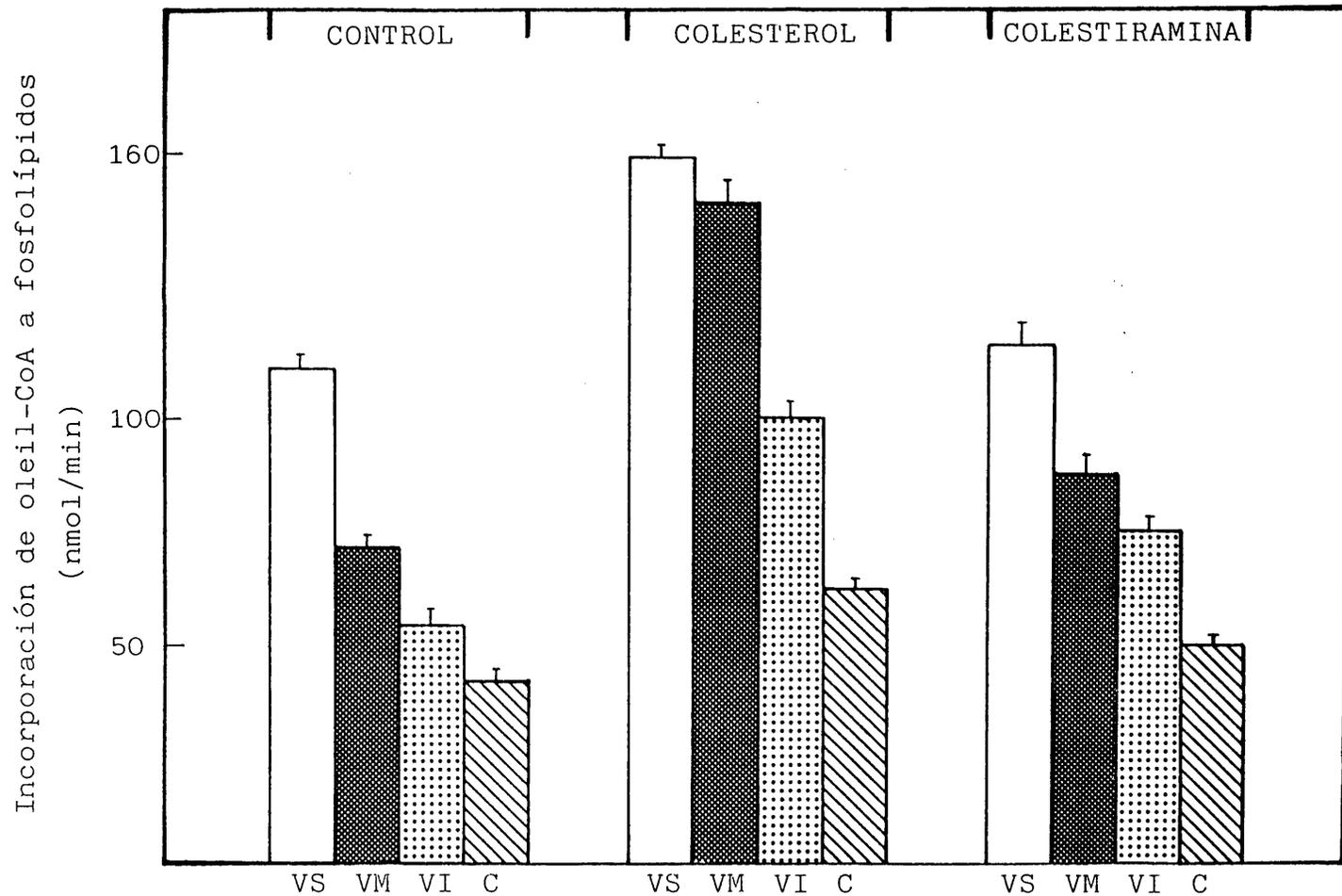


Figura 33.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-Coa a fosfolípidos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de duodeno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Los valores determinados, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 37 (fig. 32). En ella se puede apreciar que tanto con una dieta suplementada con colesterol, como con colestiramina, las actividades son muy similares a los controles, si bien cuando la dieta es suplementada con colesterol, los valores aumentaron ligeramente respecto de los controles, excepto en las criptas, que sufren una ligera disminución.

La incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, se refleja en la tabla 38 (fig. 33). Como se puede observar, las células superiores de la vellosidad son las más activas en todos los casos.

4.H.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre el metabolismo lipídico en yeyuno.

Con el objeto de establecer, en yeyuno, las posibles modificaciones en la actividad colesterogénica y lipogénica, producidas por la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, se procedió a la determinación del contenido en colesterol, así como de distintas actividades enzimáticas, en células de la vellosidad, células medias, inferiores y células de las criptas.

Los distintos ensayos se realizaron con un "pool" de células procedentes de tres pollos distintos.

4.H.1.- Efecto sobre el contenido en colesterol.

Como se muestra en los valores recogidos en

Fracción celular	Control		Colesterol		Colestiramina	
	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>
VS	25.5 \pm 0.9	24.9 \pm 0.3	50.0 \pm 0.4	40.4 \pm 0.9	34.7 \pm 0.2	33.2 \pm 1.2
VM	26.2 \pm 0.2	25.4 \pm 1.1	41.1 \pm 0.9	34.4 \pm 1.0	28.0 \pm 0.8	26.8 \pm 1.9
VI	23.8 \pm 0.7	23.4 \pm 0.5	45.9 \pm 1.8	37.0 \pm 0.4	27.6 \pm 0.4	26.6 \pm 0.4
C	28.4 \pm 0.9	26.6 \pm 1.6	42.6 \pm 1.2	35.2 \pm 0.2	25.3 \pm 0.7	23.8 \pm 0.4

Tabla 39.- Contenido en colesterol total y libre, de las distintas fracciones celulares aisladas de yeyuno de pollos alimentados con dieta control o suplementada con colesterol o colestiramina. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

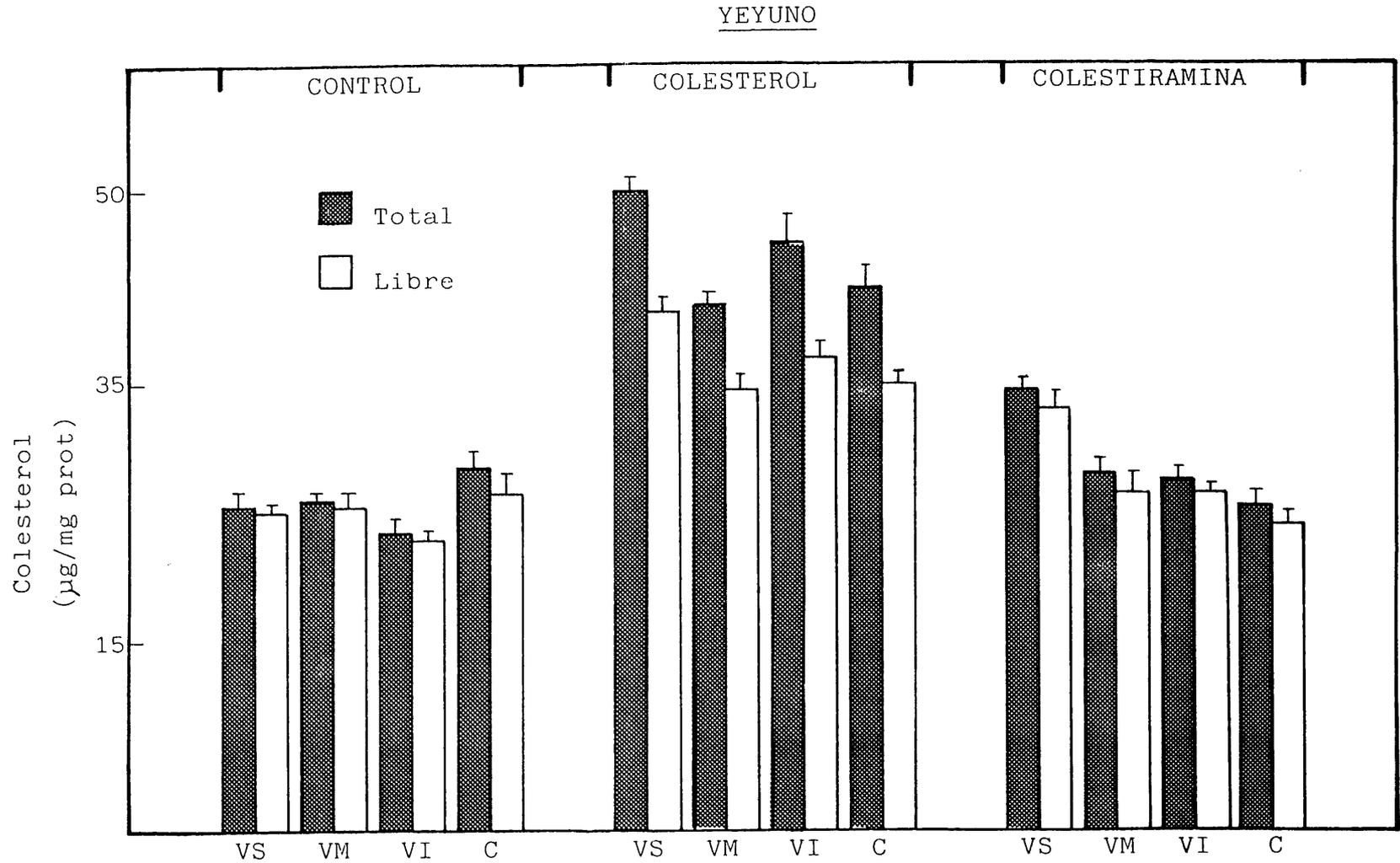


Figura 34.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de yeyuno, de pollos alimentados con una dieta control, o suplementada con colesterol o colestiramina. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

la tabla 39 (fig. 34), no se aprecian diferencias notables en el contenido en colesterol, entre los controles y los alimentados con una dieta suplementada con colestiramina. Sin embargo, cuando la dieta fué suplementada con colesterol, el contenido tanto en colesterol total como libre es más elevado, a diferencia de los no tratados o los tratados con colestiramina; el colesterol libre representa alrededor del 80% del total frente al 95% que representa en los controles, o en los tratados con colestiramina.

4.H.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa

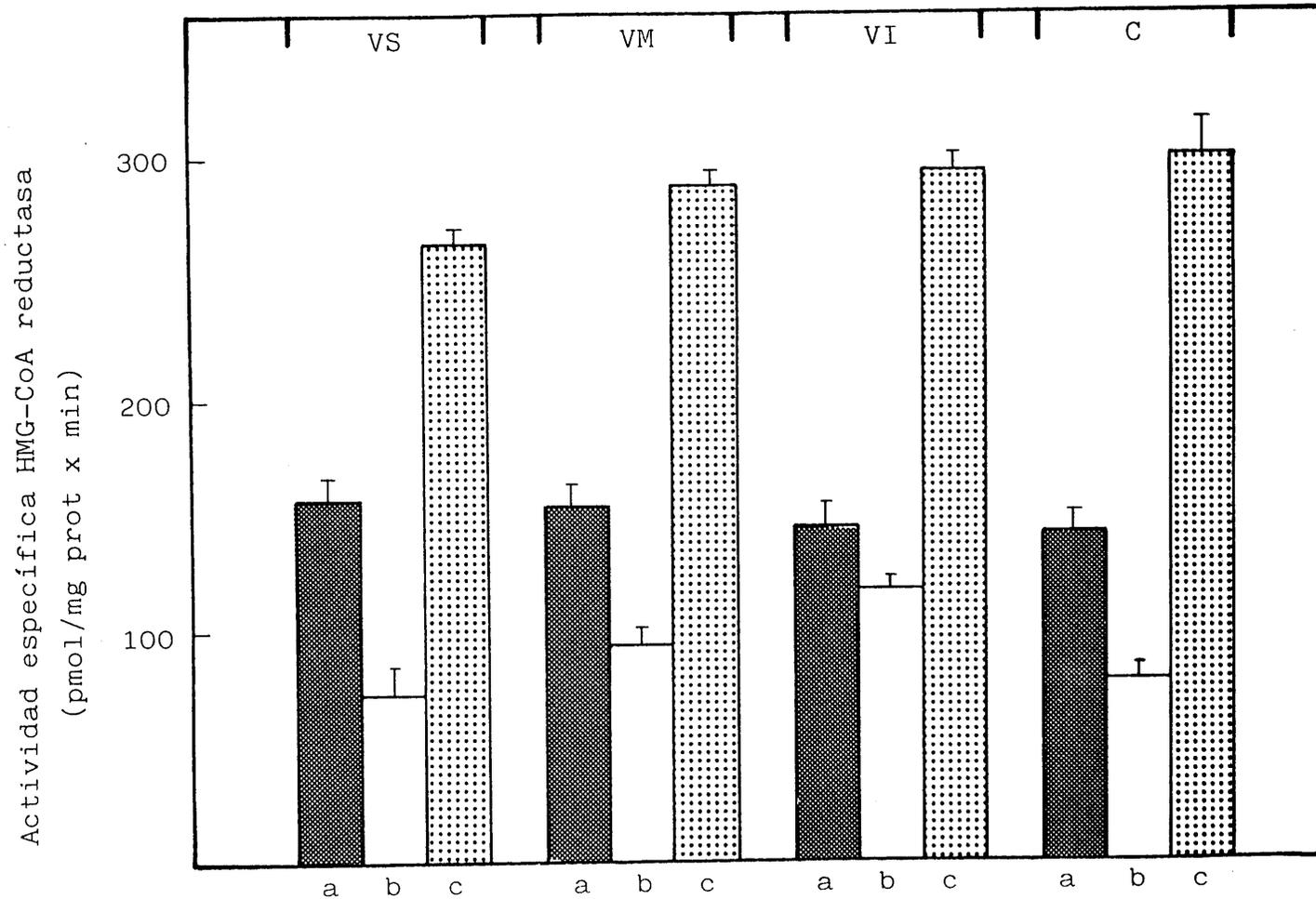
La tabla 40 (fig. 35) refleja los valores de actividad específica HMG-CoA reductasa, obtenidos tras la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, frente a los valores obtenidos con una dieta control. Se puede apreciar que la actividad es 2-3 veces superior en los pollos alimentados con colestiramina, respecto a los alimentados con una dieta control, en tanto que en los alimentados con una dieta con colesterol, las actividades representan entre el 80 y el 50% de las obtenidas en condiciones control.

En la tabla 41 (fig. 36) se muestran los valores de actividad HMG-CoA reductasa, expresados en términos de actividad total. Como se puede apreciar, tanto en condiciones control, como en los tratados con colesterol, las células superiores muestran la mayor actividad, en contraposición con los tratados con colestiramina, en los que la máxima actividad la presentan las células de las criptas.

4.H.3.- Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa

Actividad específica HMG-CoA reductasa (pmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	156.3 \pm 8.1	73.2 \pm 8.1**	265.3 \pm 6.4 ***
VM	154.9 \pm 10.3	93.4 \pm 6.5**	289.2 \pm 2.2 ***
VI	144.7 \pm 8.2	117.1 \pm 3.6*	294.6 \pm 5.5 ***
C	142.6 \pm 10.7	77.9 \pm 3.2**	302.1 \pm 12.6***

Tabla 40.-Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles: (*)p<0.05; (**)p0.01; (***)p<0.001.



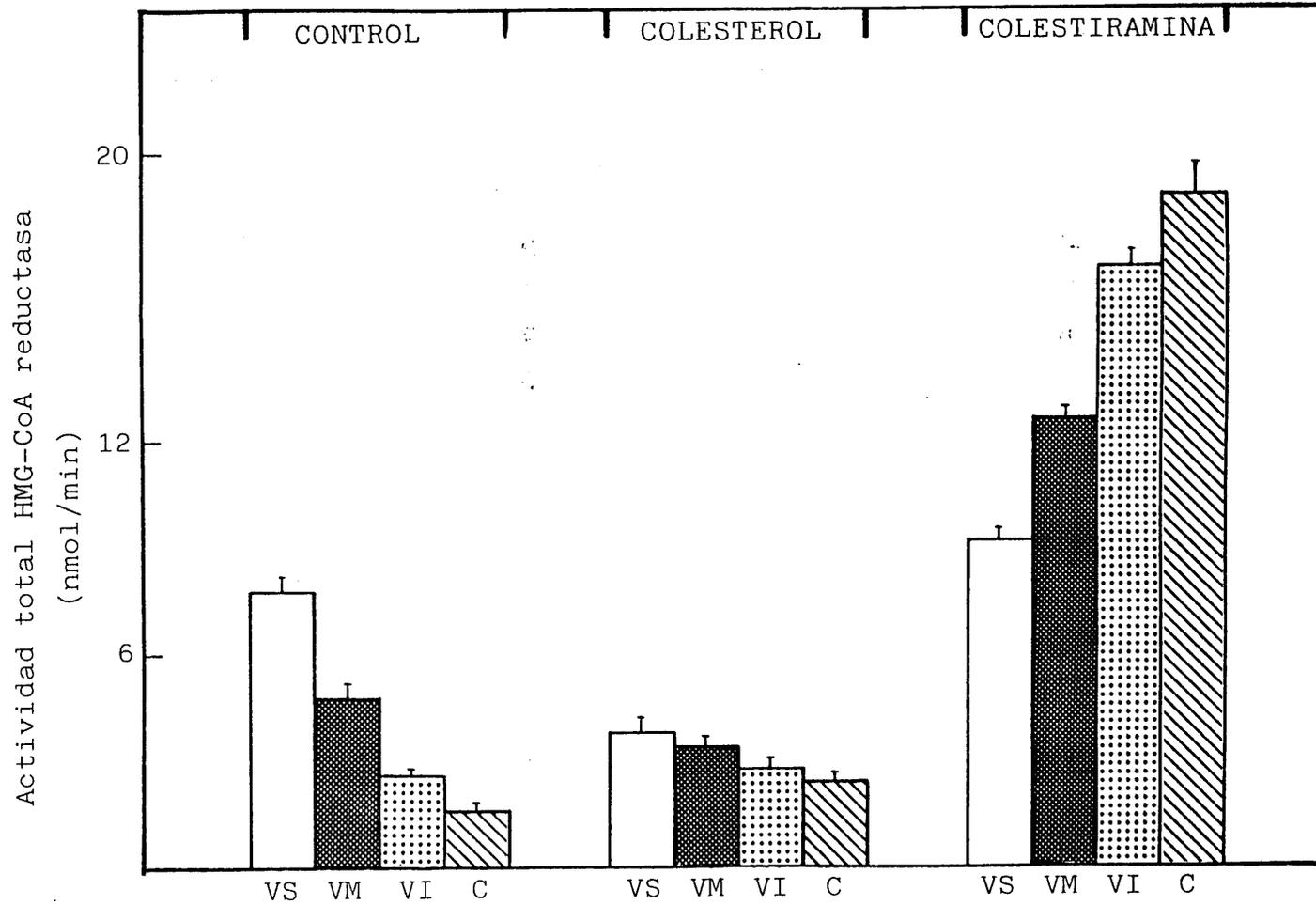
-227-

Figura 35.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI: células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Fracción celular	Actividad total HMG-CoA reductasa (nmol/min)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	7.86 \pm 0.40	3.87 \pm 0.42	9.25 \pm 0.21
VM	4.75 \pm 0.31	3.44 \pm 0.22	12.59 \pm 0.09
VI	2.57 \pm 0.14	2.89 \pm 0.07	16.77 \pm 0.28
C	1.55 \pm 0.11	1.46 \pm 0.06	18.87 \pm 0.75

Tabla 41.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. - VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

YEYUNO



-229-

Figura 36.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

El efecto sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa de una dieta suplementada con colesterol o colestiramina, frente a los valores obtenidos con una dieta control, se muestran en la tabla 42 (fig. 37). Como se puede apreciar, la dieta suplementada con colesterol reduce la actividad enzimática alrededor de un 50% de los valores obtenidos con una dieta control. En cambio en la dieta suplementada con colestiramina la actividad enzimática en las células superiores y medias de la vellosidad es alrededor de 1.3 veces superior a la determinada en los controles, pero en las células inferiores y en las de las criptas, la actividad es un 80 y un 65% respectivamente, la de los controles.

En la tabla 43 (fig. 38) se muestran los valores de la actividad PPMVA descarboxilasa, expresados en términos de actividad total. Igual que en el caso de la actividad total HMG-CoA reductasa, en condiciones control, o en los tratados con colesterol, la máxima actividad se observó en las células superiores de la vellosidad y la mínima en las de las criptas. En el caso de la dieta suplementada con colestiramina, la máxima actividad se determinó en las células de las criptas y la mínima en las células superiores de la vellosidad.

4.H.4.- Efecto sobre la actividad ACAT

Los resultados obtenidos, expresados en términos de actividad específica, se reflejan en la tabla 44 (fig. 39). Como se puede apreciar, el colesterol de la dieta activa la ACAT en cada una de las fracciones celulares estudiadas, mostrándose un gradiente de actividad descendente en el sentido células superiores -

Actividad específica PPMVA descarboxilasa
(pmol/min x mg de prot)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	44.3±1.0	26.8±1.0***	61.3±2.2**
VM	54.0±3.5	26.3±0.3**	63.4±1.0
VI	68.9±2.0	30.6±1.0***	55.0±1.0**
C	83.1±5.8	33.3±0.8***	52.6±3.0**

Tabla 42.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto de los controles: (*)p<0.05; (**)p<0.01 ; (***)p<0.001.

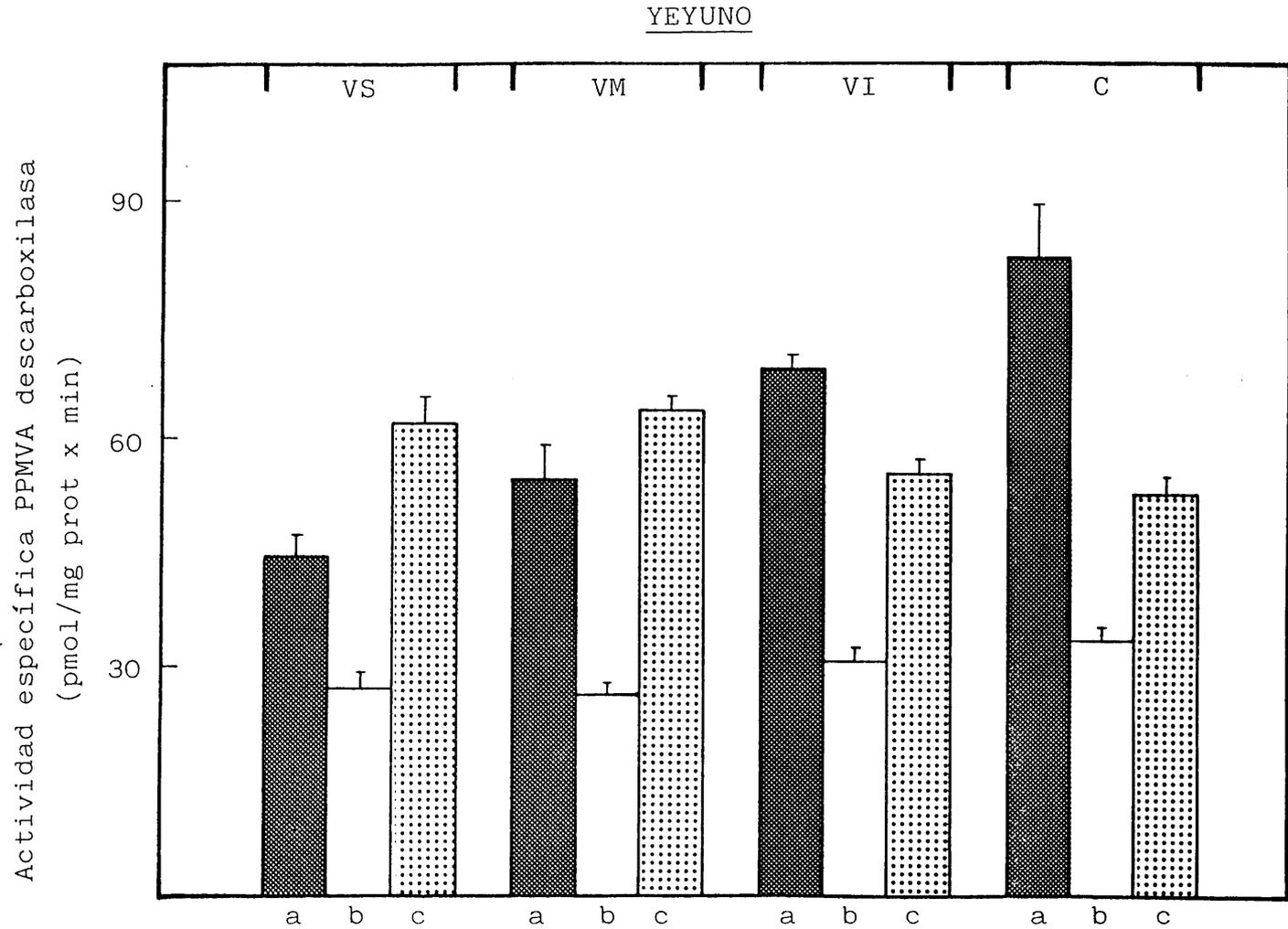


Figura 37.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica PPMVA decarboxilasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total PPMVA descarboxilasa
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	2.23 _± 0.05	1.42 _± 0.05	2.14 _± 0.08
VM	1.67 _± 0.11	0.97 _± 0.01	2.76 _± 0.04
VI	1.23 _± 0.04	0.75 _± 0.02	3.14 _± 0.06
C	0.91 _± 0.06	0.63 _± 0.02	3.29 _± 0.19

Tabla 43.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

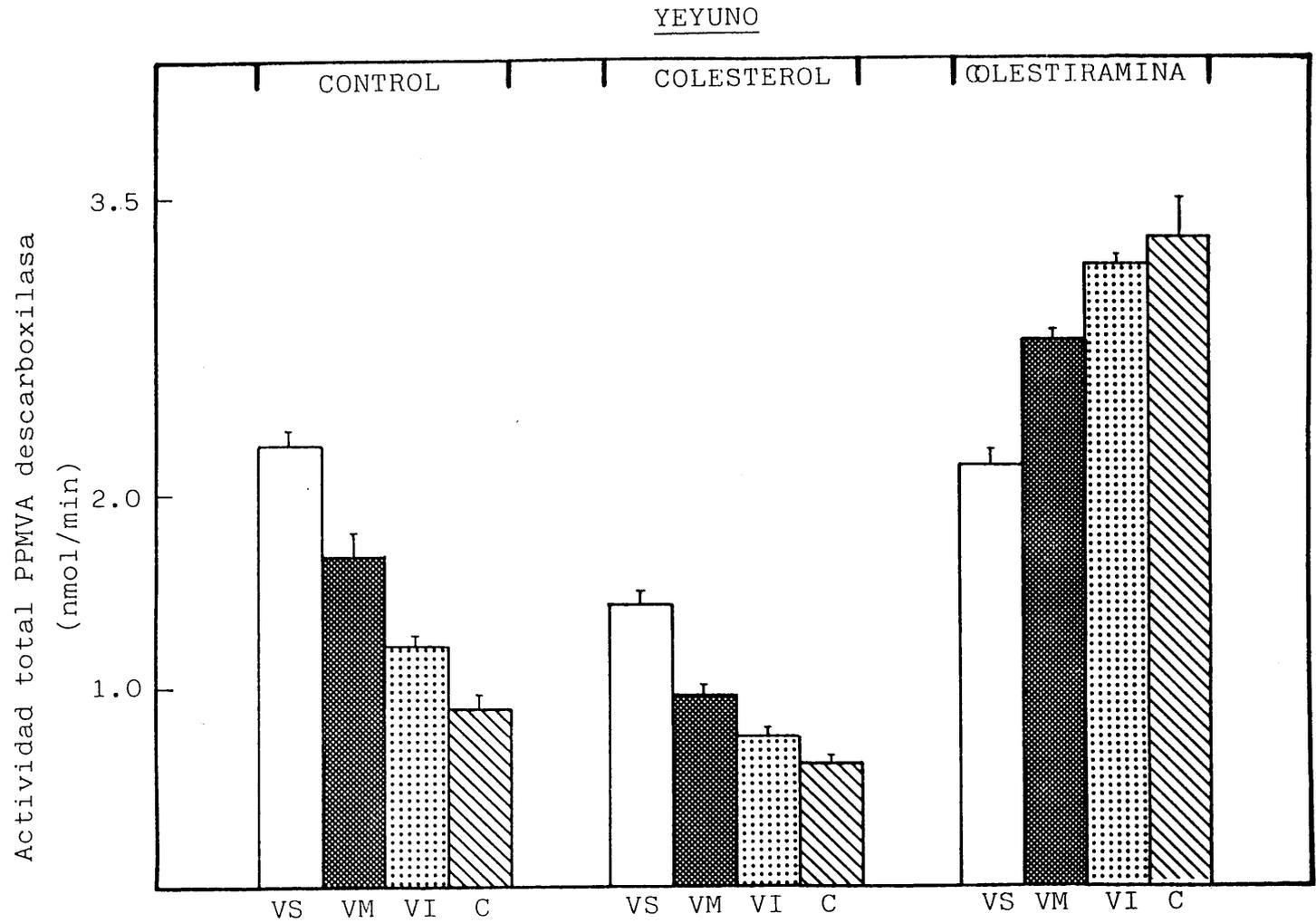


Figura 38.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total PPMVA descaboxilasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Fracción celular	Actividad específica ACAT (pmol/mg prot x min)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	274.4 \pm 44	793.4 \pm 42.3***	161.8 \pm 4.8***
VM	164.8 \pm 2.5	510.5 \pm 6.4 ***	160.1 \pm 2.6
VI	110.5 \pm 3.7	352.8 \pm 16.4***	138.5 \pm 2.1**
C	132.8 \pm 0.7	292.9 \pm 4.1 ***	121.9 \pm 2.3*

Tabla 44.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica ACAT de células apiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

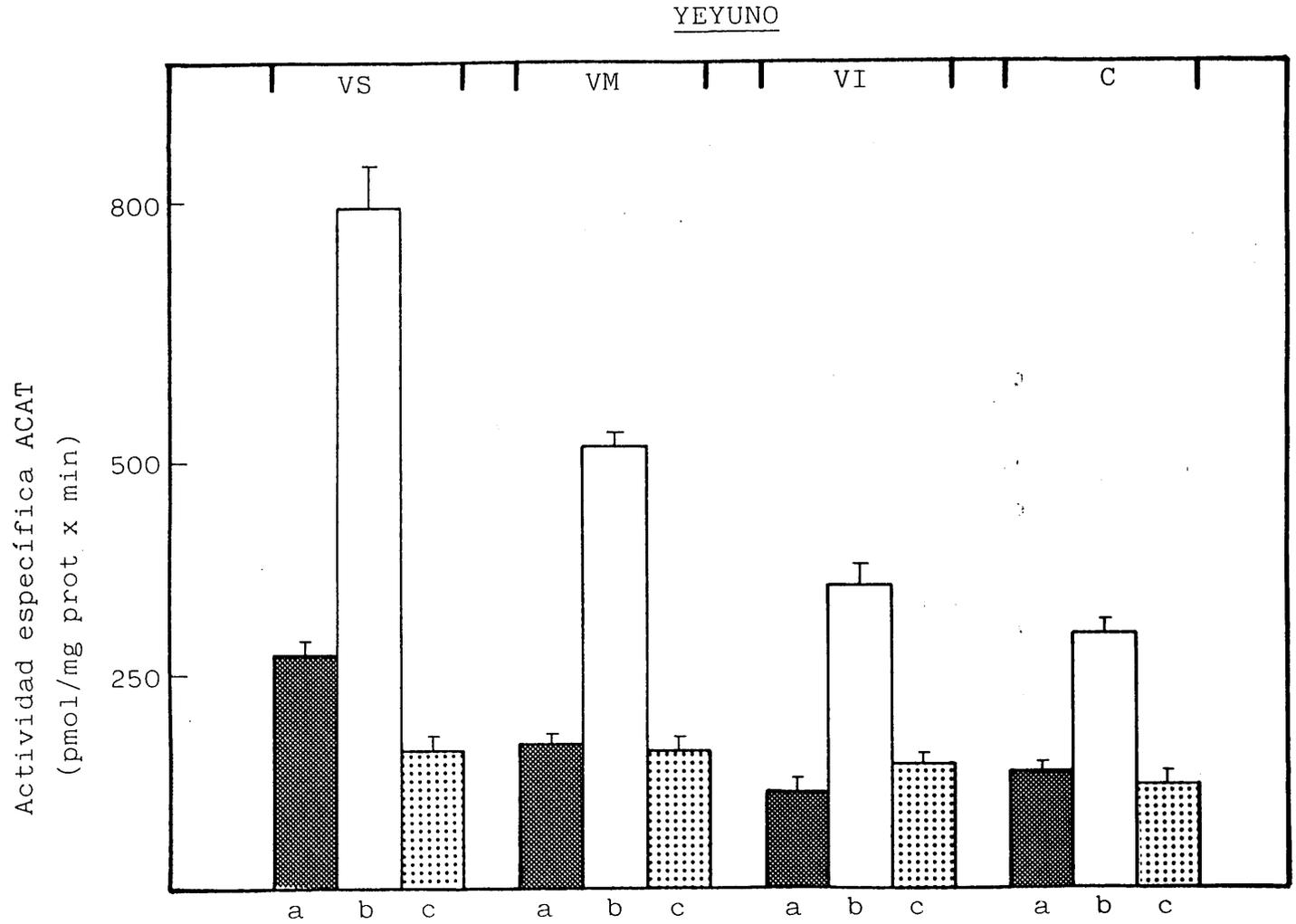


Figura 39.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a) control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total ACAT
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	13.82 _± 0.22	42.11 _± 2.24	5.65 _± 0.17
VM	5.09 _± 0.08	18.88 _± 0.23	6.97 _± 0.11
VI	1.87 _± 0.07	8.72 _± 0.40	7.90 _± 0.12
C	1.45 _± 0.01	5.58 _± 0.08	7.61 _± 0.14

Tabla 45.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

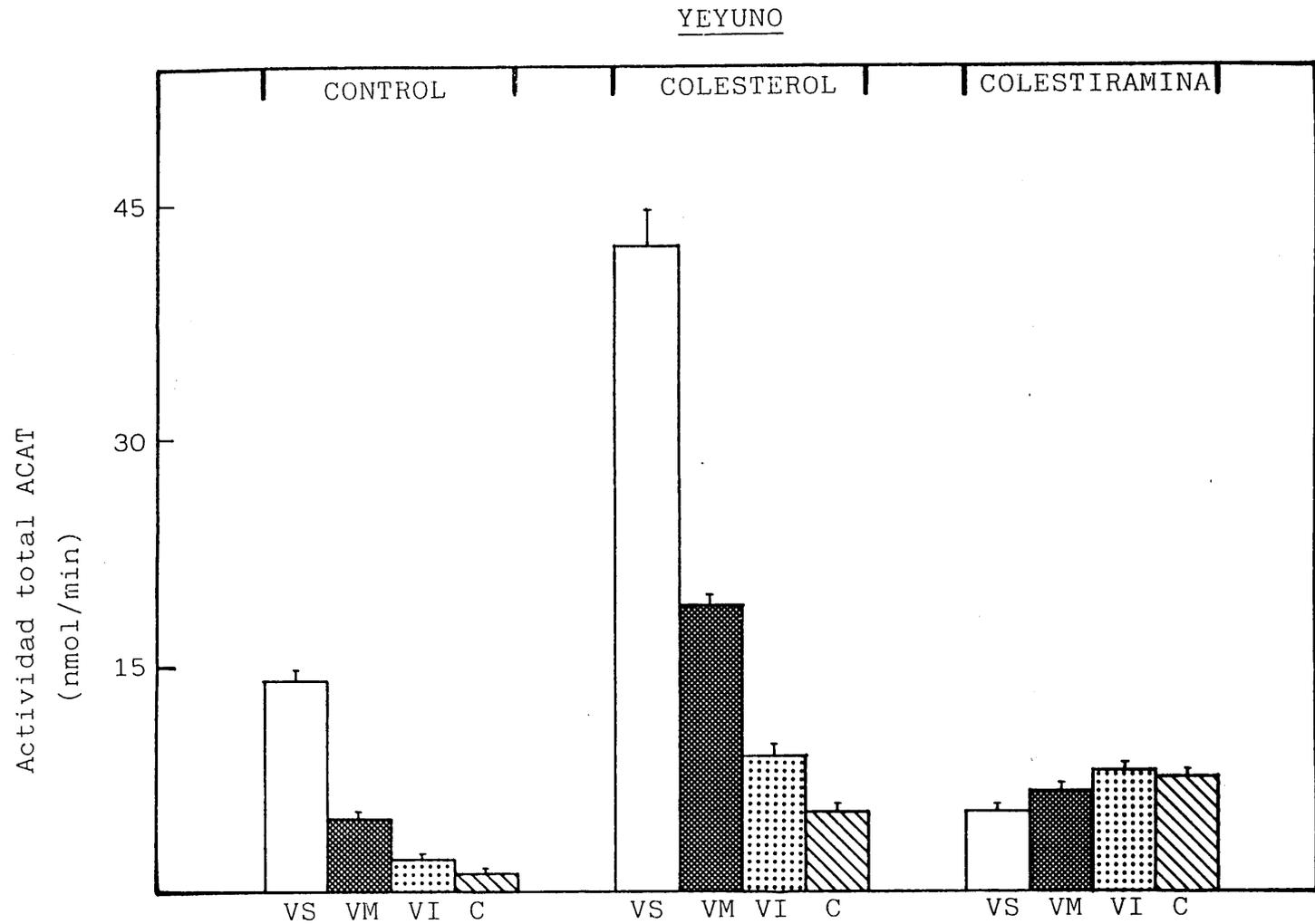


Figura 40.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vello-sidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

criptas. En cambio, en la dieta suplementada con colestiramina, la actividad ACAT es muy similar a la determinada en los controles, excepto en las células superiores de la velloidad, en las que es ligeramente inferior.

En la tabla 45 (fig. 40) se muestran los valores de la actividad ACAT, expresados en términos de actividad total. Tanto en los controles, como cuando la dieta fué suplementada con colesterol, la máxima actividad se determinó en las células superiores de la velloidad y la mínima en las células de las criptas. Cuando la dieta fué suplementada con colestiramina, las actividades encontradas en cada una de las fracciones celulares recogidas fué muy similar.

4.H.5.- Efecto sobre la actividad acil-CoA hidrolasa

Con el objeto de determinar si la hidrolisis del oleil-CoA se veía afectada por la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, se ensayó la actividad acil-CoA hidrolasa en condiciones control y con dietas suplementadas con colesterol o colestiramina. Como se muestra en la tabla 46 (fig. 41), las diferencias no fueron significativas.

4.H.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos.

Los valores obtenidos en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 47 (fig. 42). La suplementación de la dieta con colesterol produjo ligeros aumentos de la actividad respecto controles en células superiores, medias e inferiores y práctica-

Fracción celular	Actividad específica Acil-CoA hidrolasa (nmol/mg prot x min)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	7.16 \pm 0.40	6.93 \pm 0.64	7.49 \pm 0.62
VM	8.27 \pm 0.28	6.67 \pm 0.28	7.16 \pm 0.40
VI	7.84 \pm 0.27	8.51 \pm 0.33	6.29 \pm 0.58
C	8.41 \pm 0.10	7.65 \pm 0.36	6.80 \pm 0.24**

Tabla 46.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de ye-yuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (**) $p < 0.01$.

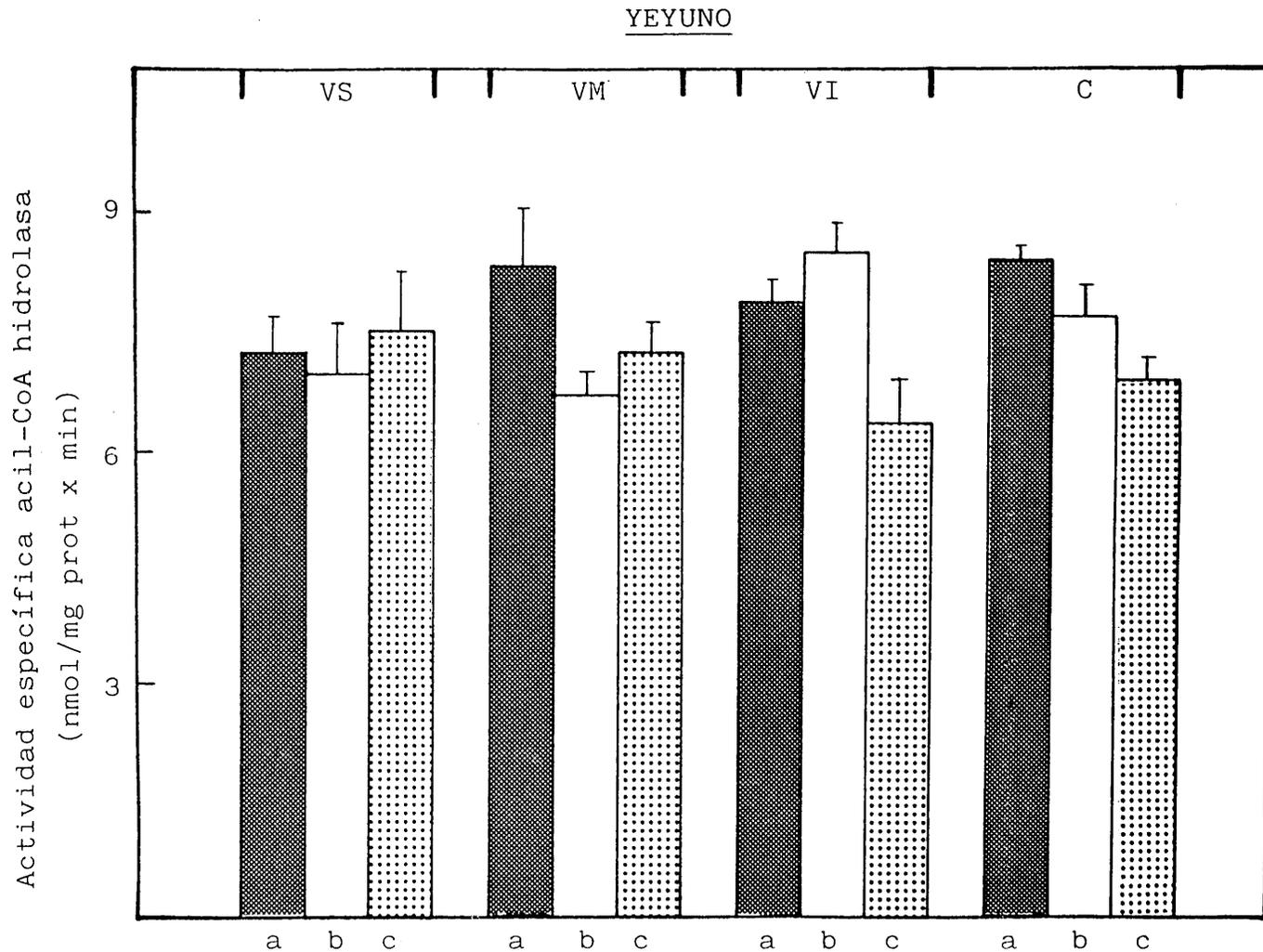


Figura 41.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	892 _± 9	1181 _± 46**	558 _± 18***
VM	645 _± 7	733 _± 15**	458 _± 21**
VI	418 _± 18	595 _± 22**	406 _± 26
C	438 _± 7	409 _± 19	453 _± 14

Tabla 47.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de yeyuno . VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles: (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

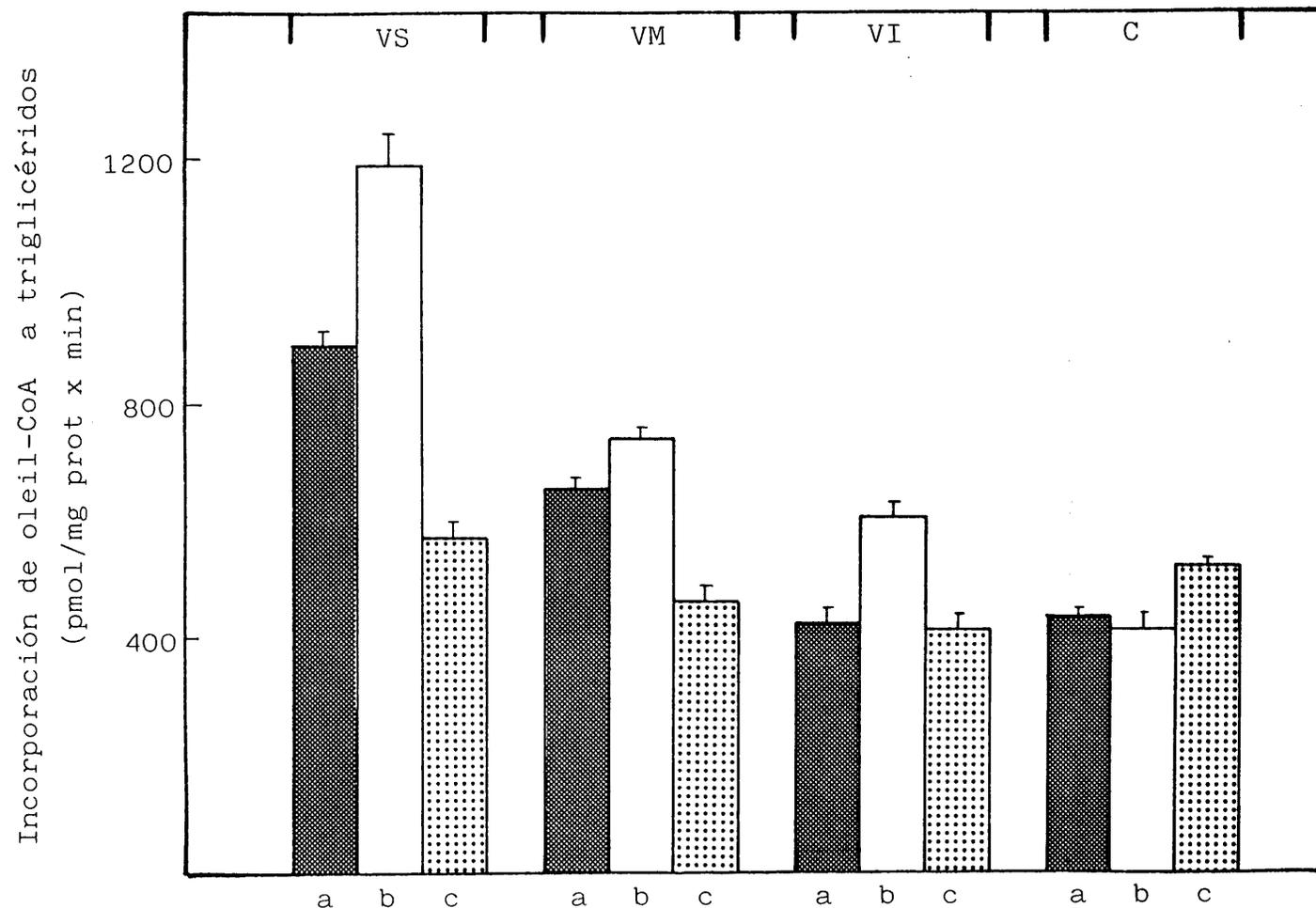


Figura 42.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	44.93±0.45	63.42±2.44	19.49±0.63
VM	19.91±0.22	27.11±0.55	19.95±0.91
VI	7.46±0.32	14.71±0.54	23.16±1.48
C	4.79±0.08	7.79±0.36	28.30±0.87

Tabla 48.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad total, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias, VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.

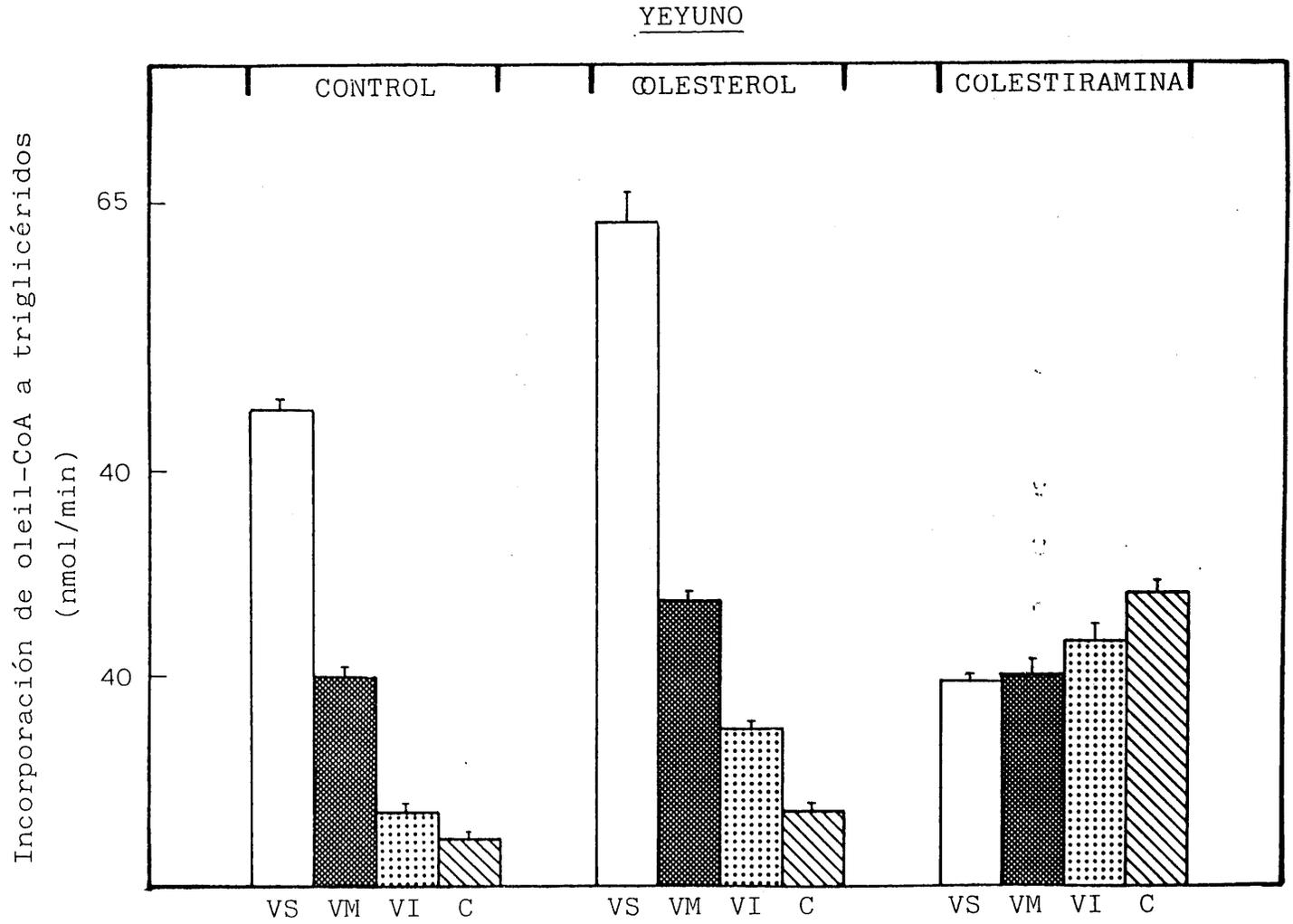


Figura 43.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.

mente no afectó a las de las criptas. En cambio la suplementación de la dieta con colestiramina indujo un descenso de la actividad en células superiores y medias de la vellosidad, y no afectó prácticamente a las células inferiores y a las de las criptas.

En la tabla 48 (fig. 43) se muestra la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad total. Las células superiores de la vellosidad muestran la máxima actividad, y las de las criptas la mínima, tanto en condiciones control como cuando la dieta fué suplementada con colesterol. Cuando la dieta fué suplementada con colestiramina, las diferencias de actividad entre las distintas fracciones eran menores que en las condiciones anteriormente mencionadas, presentando la máxima actividad las células de las criptas.

4.H.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.

Los valores determinados, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 49 (fig. 44). Tanto en las condiciones control como cuando la dieta fué suplementada con colestiramina o colesterol, se observa un gradiente de actividad creciente desde las células de las criptas a las células superiores de la vellosidad.

No se observaron grandes diferencias entre las condiciones control y los tratados con colesterol o colestiramina.

La incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, se refleja en la tabla 50 (fig. 43). Tanto en las condiciones control,

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/mg prot x min) :

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	2.90 \pm 0.08	3.51 \pm 0.26	2.34 \pm 0.24
VM	2.48 \pm 0.33	2.28 \pm 0.14	2.07 \pm 0.04
VI	1.82 \pm 0.08	1.98 \pm 0.12	1.65 \pm 0.06
C	1.88 \pm 0.04	1.69 \pm 0.02*	1.50 \pm 0.16

Tabla 49.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS: células superiores de la velloidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. - Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student, respecto a los controles: (*)p<0.05.

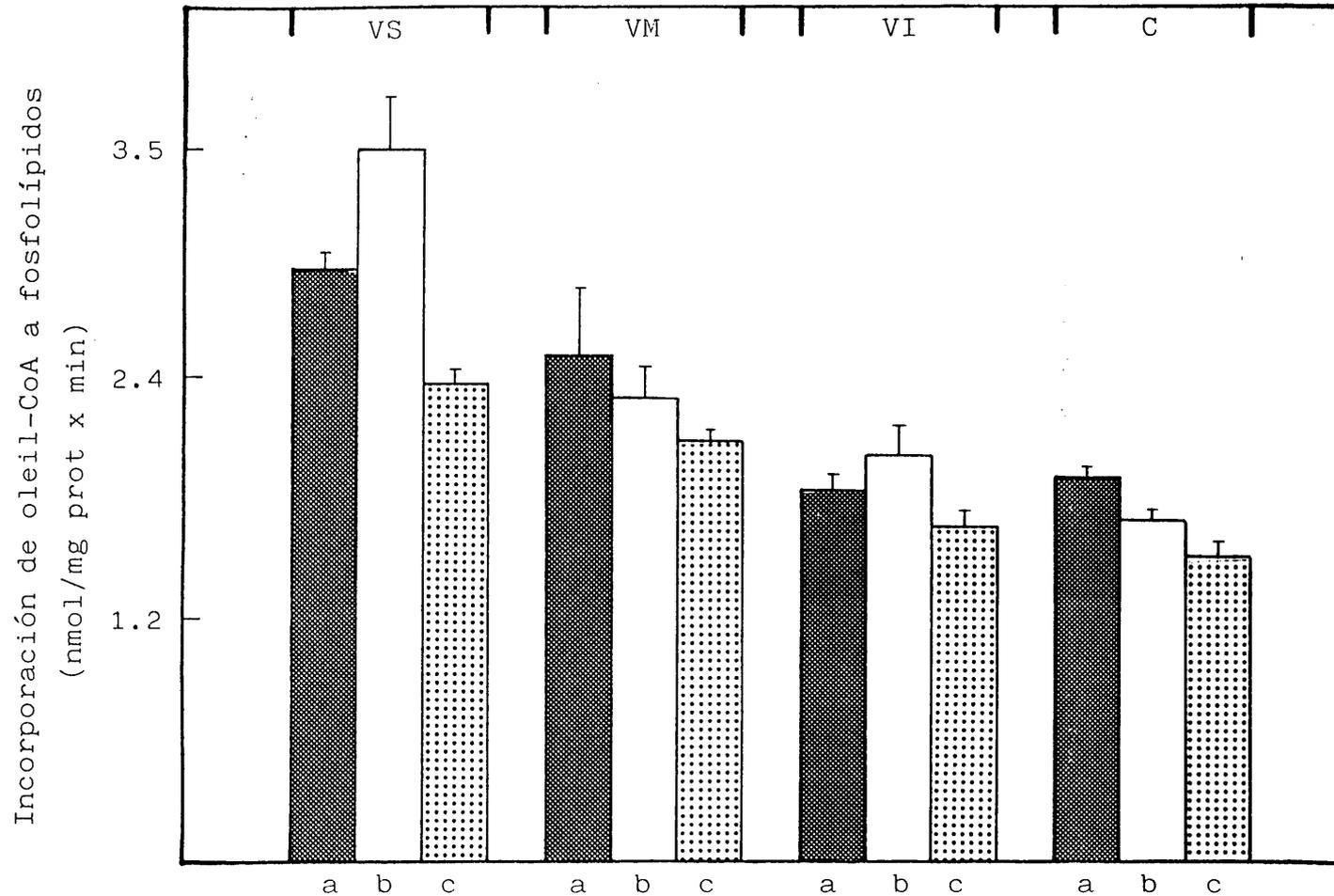


Figura 44.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI: células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	146.15 \pm 4.18	186.48 \pm 13.75	81.80 \pm 1.53
VM	96.56 \pm 7.31	84.42 \pm 5.21	90.17 \pm 2.05
VI	32.50 \pm 3.06	49.09 \pm 3.06	94.03 \pm 3.25
C	20.54 \pm 0.46	32.16 \pm 0.44	94.03 \pm 4.06

Tabla 50.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, en células epiteliales aisladas de yeyuno. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas.

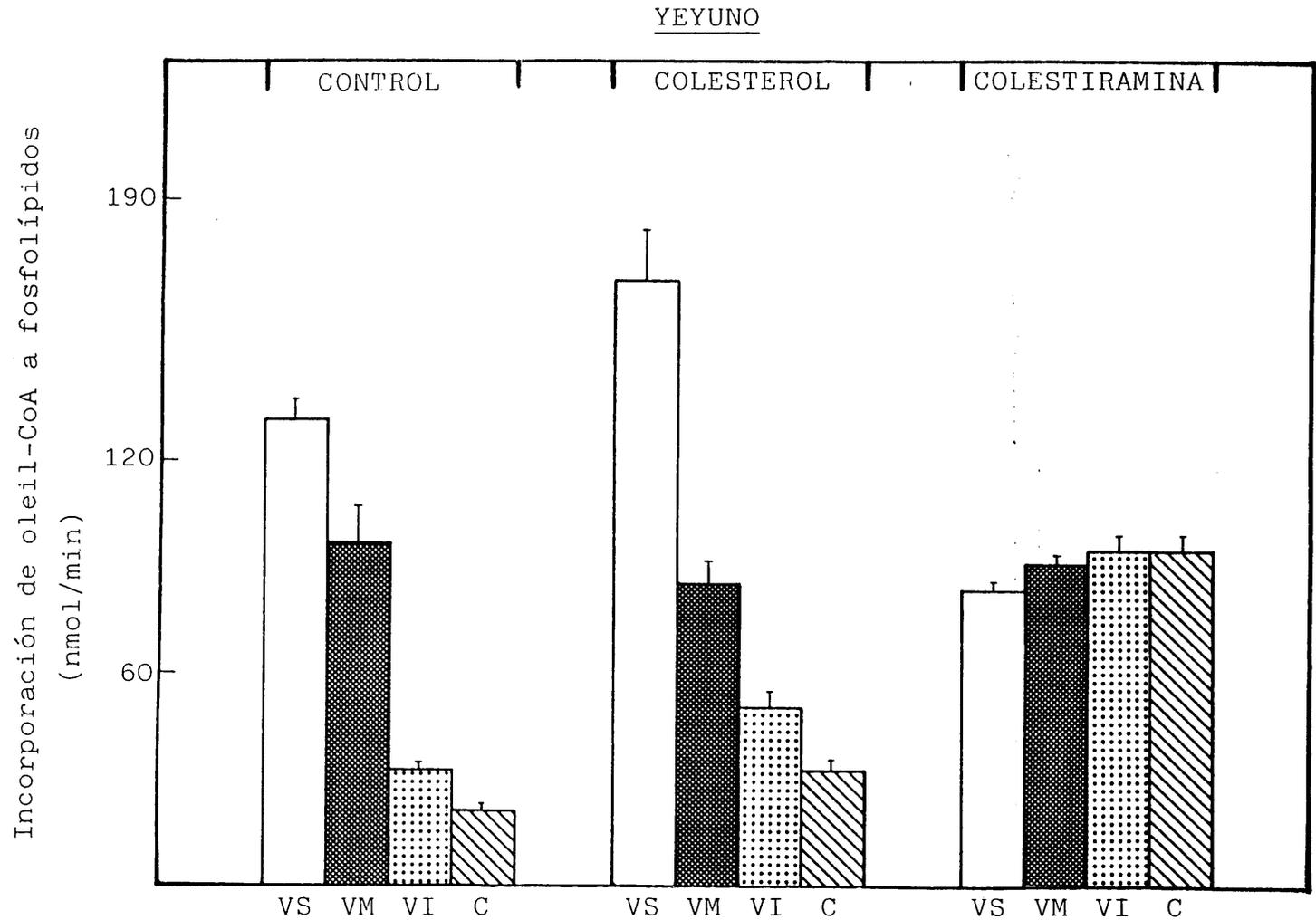


Figura 45.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de yeyuno. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; Vi:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.

como cuando la dieta fué suplementada con colesterol, se apreció un gradiente de actividad creciente desde las células de las criptas a las células superiores de la vellosidad. Cuando la dieta fué suplementada con colestiramina, la actividad fué equivalente en todas las fracciones celulares.

4.I. Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre el metabolismo lipídico en íleon.

Con el objeto de establecer, en íleon, las posibles modificaciones en la actividad colesterogénica y lipogénica, producidas por la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, se procedió a la determinación del contenido en colesterol, así como de distintas actividades enzimáticas, en células superiores de la vellosidad, medias, inferiores y células de las criptas.

Los distintos ensayos se realizaron con células procedentes de tres pollos distintos.

4.I.1.- Efecto sobre el contenido en colesterol.

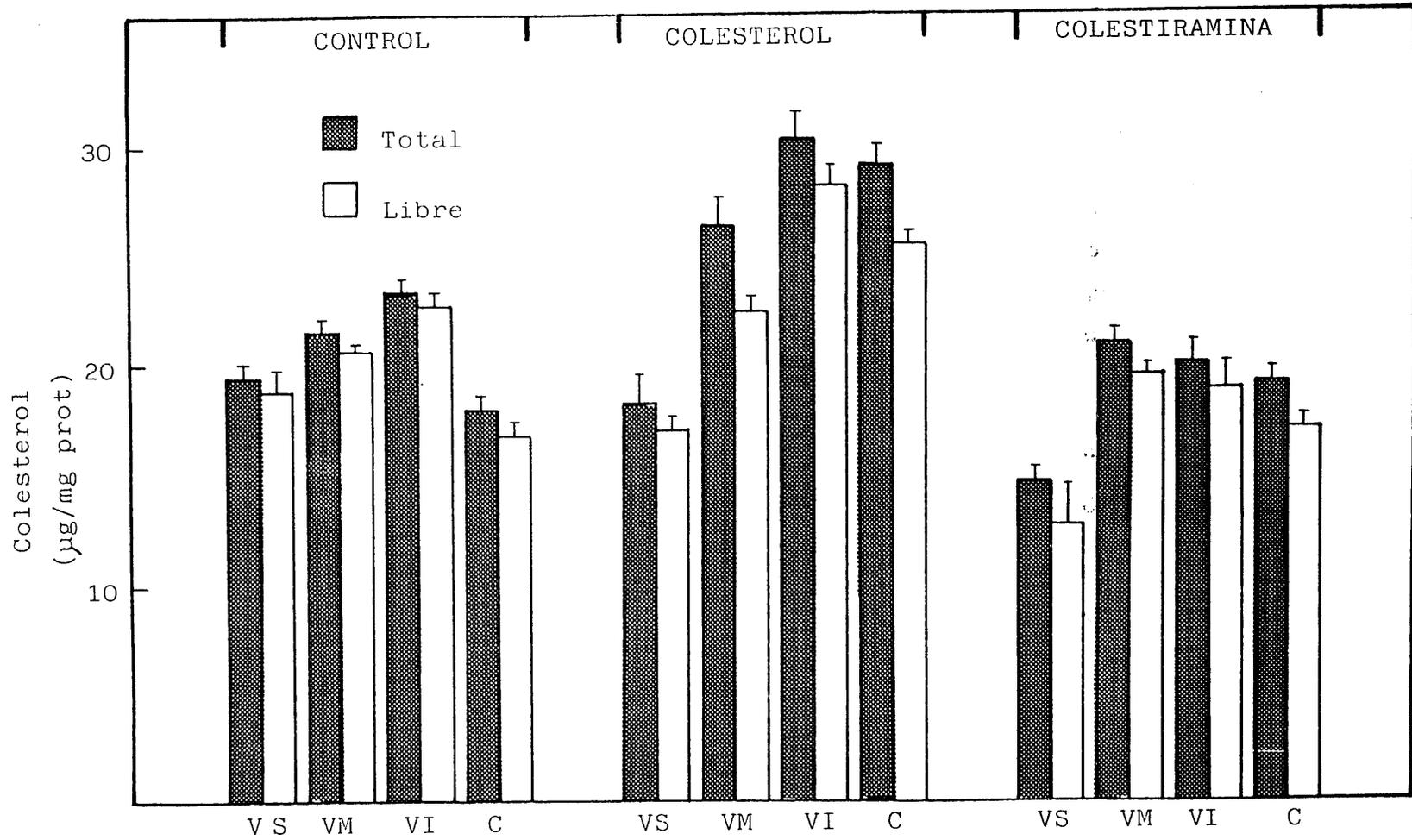
Como se muestra en los valores recogidos en la tabla 51 (fig. 46), los niveles mas altos de colesterol, tanto total como libre, se determinaron en pollos tratados con colesterol. Tanto en los controles como en los tratados con colestiramina, los contenidos en colesterol total y libre eran equivalentes, e inferiores a los determinados en pollos con dieta suplementada con colesterol.

En los controles, el contenido en colesterol

Fracción celular	Control		Colesterol		Colestiramina	
	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>	<u>Total</u> ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	<u>Libre</u>
VS	19.5 \pm 0.1	19.1 \pm 1.4	18.4 \pm 0.7	17.8 \pm 0.5	14.7 \pm 0.5	12.6 \pm 2.2
VM	21.6 \pm 0.4	20.7 \pm 0.4	26.5 \pm 1.1	22.5 \pm 0.5	21.2 \pm 0.5	19.6 \pm 0.1
VI	23.5 \pm 0.3	22.8 \pm 0.6	31.0 \pm 1.1	28.1 \pm 0.8	20.2 \pm 0.8	18.8 \pm 1.0
C	18.1 \pm 0.4	16.7 \pm 0.1	29.3 \pm 0.9	25.7 \pm 0.2	19.3 \pm 0.5	17.0 \pm 0.3

Tabla 51.- Contenido en colesterol total y libre, de las distintas fracciones celulares aisladas de íleon de pollos alimentados con dietas control o suplementada con colesterol o -colestiramina. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

ILEON



-253-

Figura 46.- Contenido en colesterol total y libre de las distintas fracciones celulares aisladas de íleon, de pollos alimentados con una dieta control, o suplementada con colestiramina o colesterol. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones \pm S.E.M.

libre representa en torno al 95% del colesterol total, mientras que en los tratados con colesterol o colestiramina, representa alrededor del 90%.

4.I.2.- Efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

La tabla 52 (fig. 47) refleja los valores de actividad específica HMG-CoA reductasa, obtenidos tras la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, frente a los valores obtenidos con una dieta control. Se puede apreciar que la actividad es alrededor del doble en los pollos alimentados con colestiramina, respecto a los alimentados con una dieta control. En cambio, cuando la dieta fué suplementada con colesterol, la actividad es alrededor del 30% de los valores determinados en condiciones control.

En la tabla 53 (fig. 48), se muestran los valores de actividad HMG-CoA reductasa, expresados en términos de actividad total. En cualquiera de las dos condiciones estudiadas, se observa, que la máxima actividad corresponde a las células inferiores de la vello-sidad y a las de las criptas.

4.I.3.- Efecto sobre la actividad PPMVA descarboxilasa

El efecto sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa, de una dieta suplementada con colesterol o colestiramina, frente a los valores obtenidos con una dieta control, se muestran en la tabla 54 (fig. 49). En ella se puede apreciar que cuando la dieta es suplementada con colesterol, la actividad queda reducida entre un 40% (células de las criptas) y un 80% (células superiores de la vello-sidad) respecto de los valores obtenidos con una dieta control. En cambio, con una

Actividad específica HMG-CoA reductasa (pmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	79.8 _± 6.0	25.7 _± 1.8***	172.6 _± 4.8 ***
VM	84.5 _± 4.5	30.5 _± 2.0***	188.2 _± 9.3 ***
VI	82.6 _± 3.2	26.8 _± 1.2***	176.0 _± 7.2 ***
C	96.3 _± 5.7	31.0 _± 0.5***	200.8 _± 12.1**

Tabla 52.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de Ileon VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y - C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (***) p<0.01; (***) p<0.001.

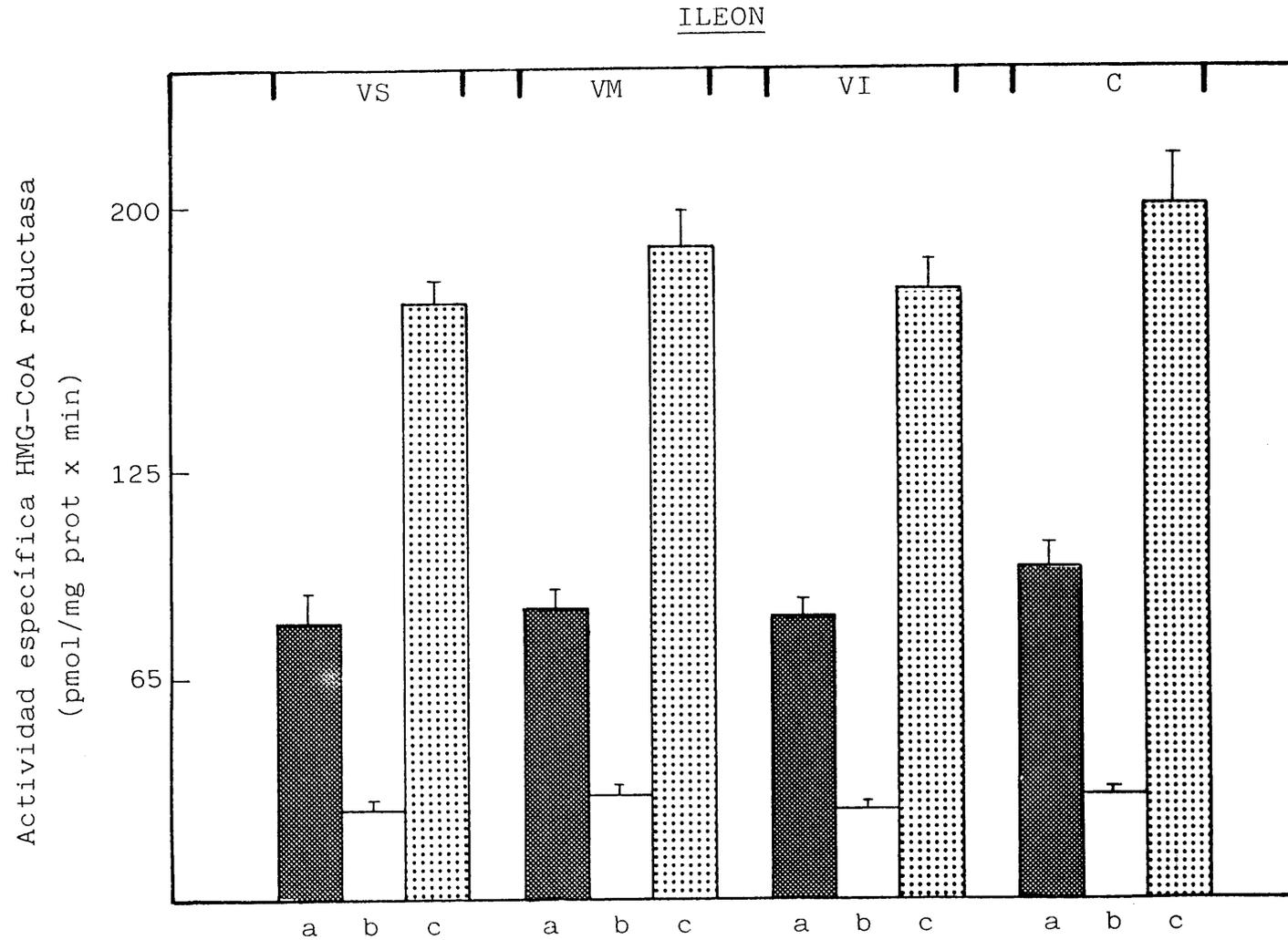


Figura 47.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total HMG-CoA reductasa (nmol/min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	0.63 _± 0.05	0.07 _± 0.01	1.13 _± 0.03
VM	1.37 _± 0.08	0.23 _± 0.01	3.99 _± 0.20
VI	0.88 _± 0.03	0.47 _± 0.02	3.56 _± 0.14
C	0.96 _± 0.06	0.77 _± 0.01	3.50 _± 0.21

Tabla 53.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

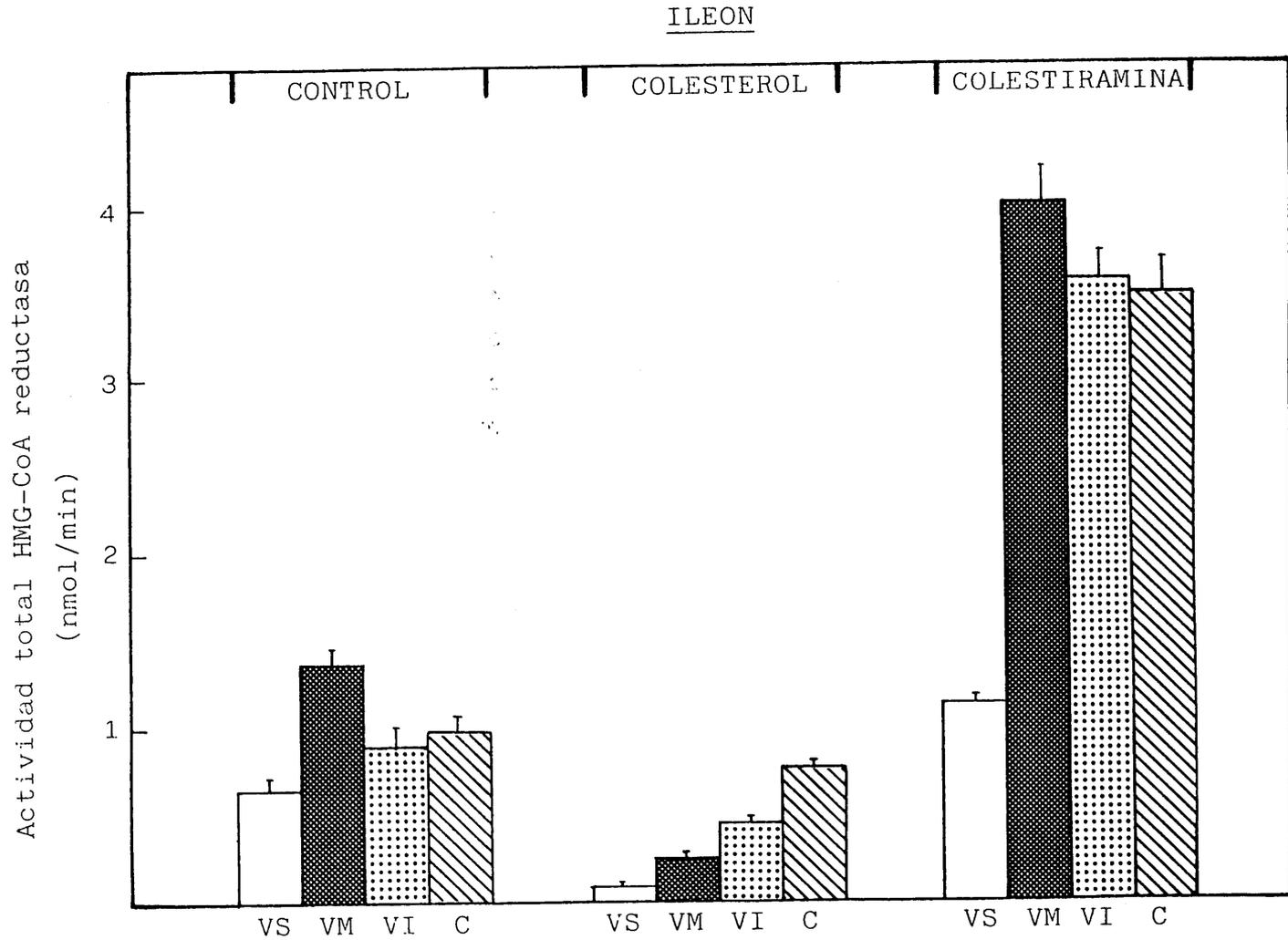


Figura 48.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total HMG-CoA reductasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica PPMVA descarboxilasa (pmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	48.6 \pm 2.4	41.9 \pm 0.7	54.0 \pm 0.6
VM	50.4 \pm 5.9	31.1 \pm 3.6*	72.2 \pm 2.7*
VI	68.6 \pm 6.3	39.3 \pm 1.6*	80.0 \pm 1.9
C	84.7 \pm 0.2	34.5 \pm 2.2***	95.6 \pm 5.1

Tabla 54.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (*)p<0.05; (**)p<0.01; (***)p<0.001.

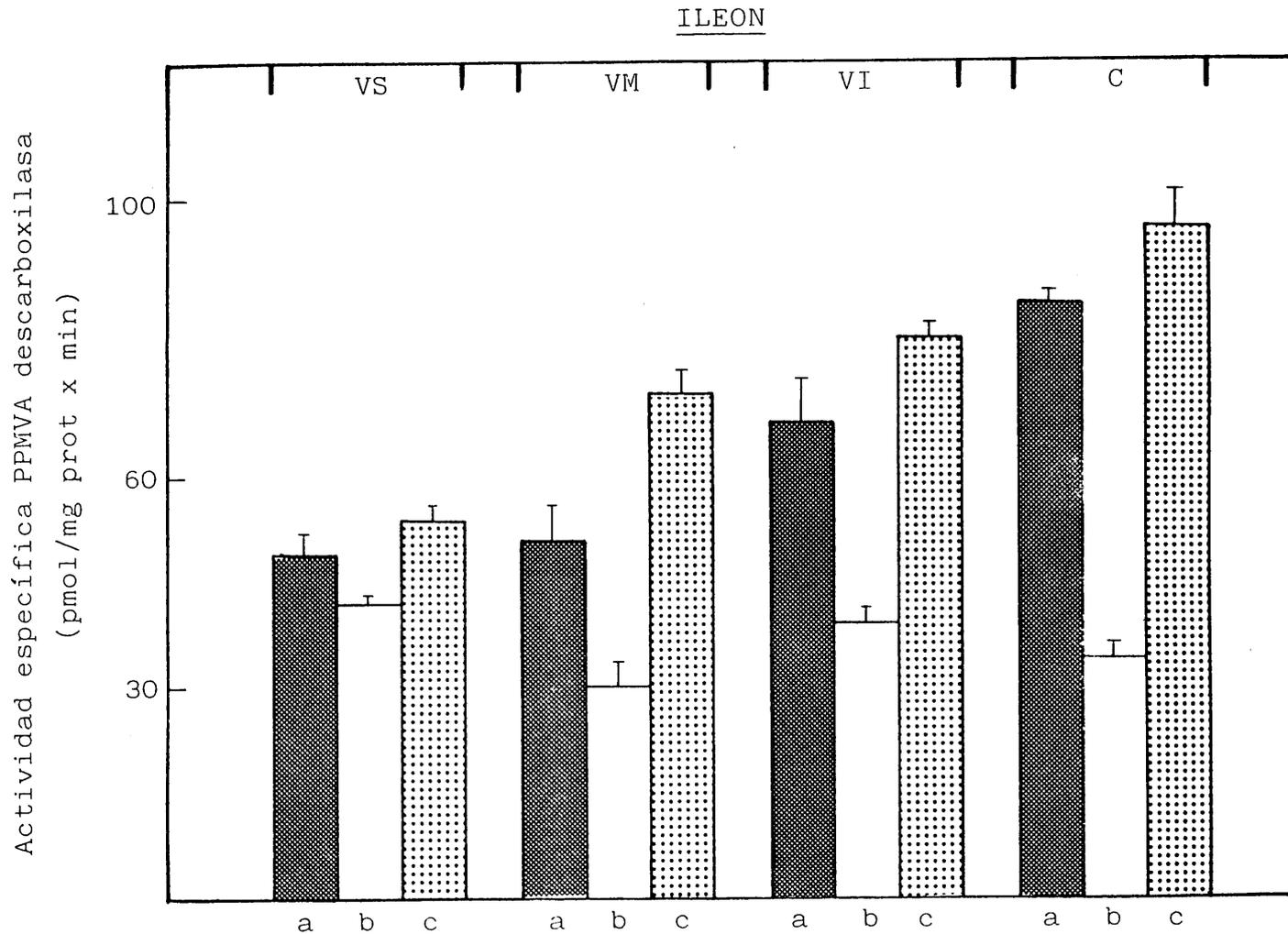


Figura 49.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad total PPMVA descarboxilasa
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	0.38 _± 0.02	0.11 _± 0.01	0.35 _± 0.01
VM	0.81 _± 0.09	0.23 _± 0.02	1.53 _± 0.05
VI	0.74 _± 0.06	0.68 _± 0.03	1.62 _± 0.04
C	0.84 _± 0.02	0.86 _± 0.05	1.67 _± 0.09

Tabla 55.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones _± S.E.M.

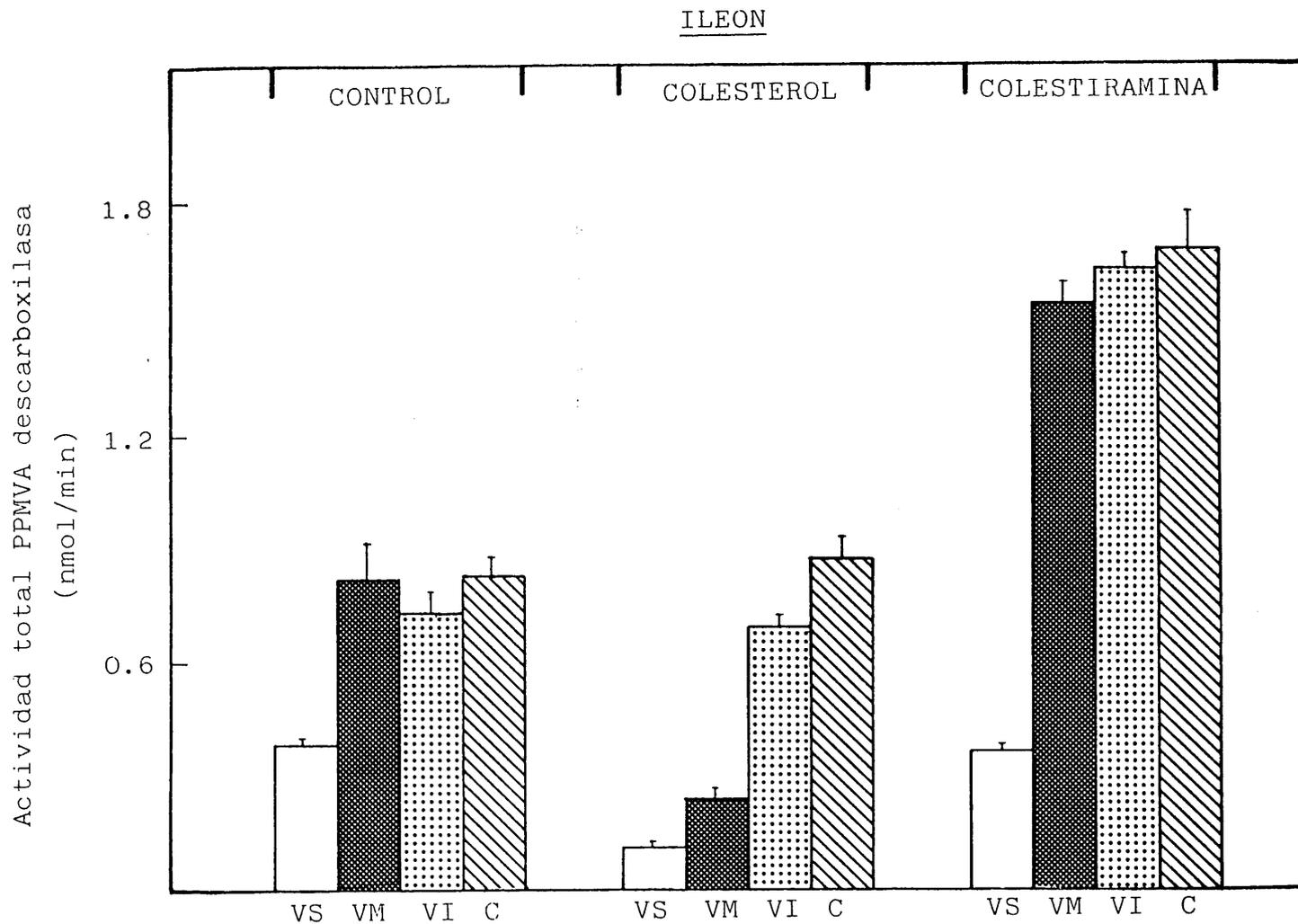


Figura 50.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total PPMVA descarboxilasa de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica ACAT (pmol/min x mg prot)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	156.1 \pm 5.0	632.1 \pm 9.3 ***	303.6 \pm 8.1***
VM	190.4 \pm 5.1	516.2 \pm 4.4 ***	268.0 \pm 6.4***
VI	185.7 \pm 18.6	397.4 \pm 9.2 ***	243.3 \pm 8.2*
C	157.7 \pm 5.7	334.5 \pm 12.9***	201.1 \pm 8.4*

Tabla 56.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad. VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S. E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto a los controles (*)p < 0.05; (**)p < 0.01; (***)p < 0.001.

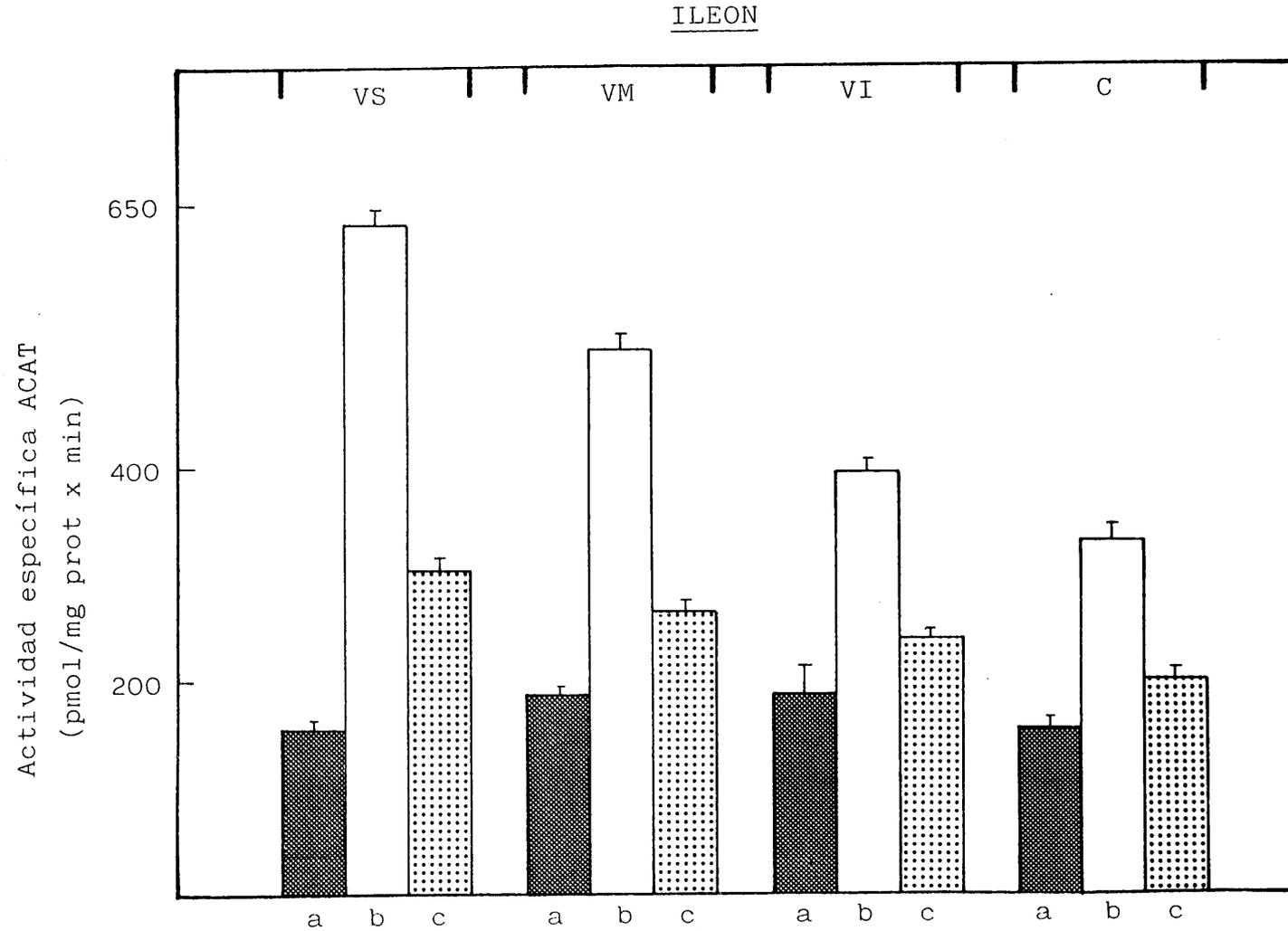


Figura 51.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica ACAT de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.

dieta suplementada con colestiramina, la actividad se incrementó alrededor de 1.5 veces en todas las fracciones estudiadas.

En la tabla 55 (fig. 50) se muestran los valores de actividad PPMVA descarboxilasa, expresados en términos de actividad total. En cualquiera de las dos condiciones estudiadas se observa que la máxima actividad corresponde a las células de las criptas y la mínima a las células superiores de la vellosidad.

4.I.4.- Efecto sobre la actividad ACAT

Los resultados obtenidos, expresados en términos de actividad específica, se reflejan en la tabla 56 (fig. 51). En todas las fracciones celulares estudiadas, la dieta suplementada con colesterol, incrementa la actividad ACAT entre 2 (células de las criptas) y 4 veces (células superiores de la vellosidad) los valores obtenidos con una dieta control.

La dieta suplementada con colestiramina, también incrementa la actividad específica ACAT en todas las fracciones celulares aisladas

En la tabla 57 (fig. 52), se recogen los valores de la actividad ACAT, expresados en términos de actividad total. La máxima actividad observada corresponde a las condiciones en las que la dieta fue suplementada con colesterol.

4.I.5.- Efecto sobre la actividad acil-Coa hidrolasa

Con el objeto de determinar si la hidrólisis de oleil-CoA se veía afectada por la suplementación de

Fracción celular	Actividad total ACAT (nmol/min)		
	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	1.23±0.04	1.68±0.02	1.99±0.05
VM	3.09±0.08	3.83±0.03	5.69±0.13
VI	1.99±0.33	6.93±0.16	4.92±0.16
C	1.57±0.06	8.35±0.32	3.51±0.14

Tabla 57.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones ±S.E.M.

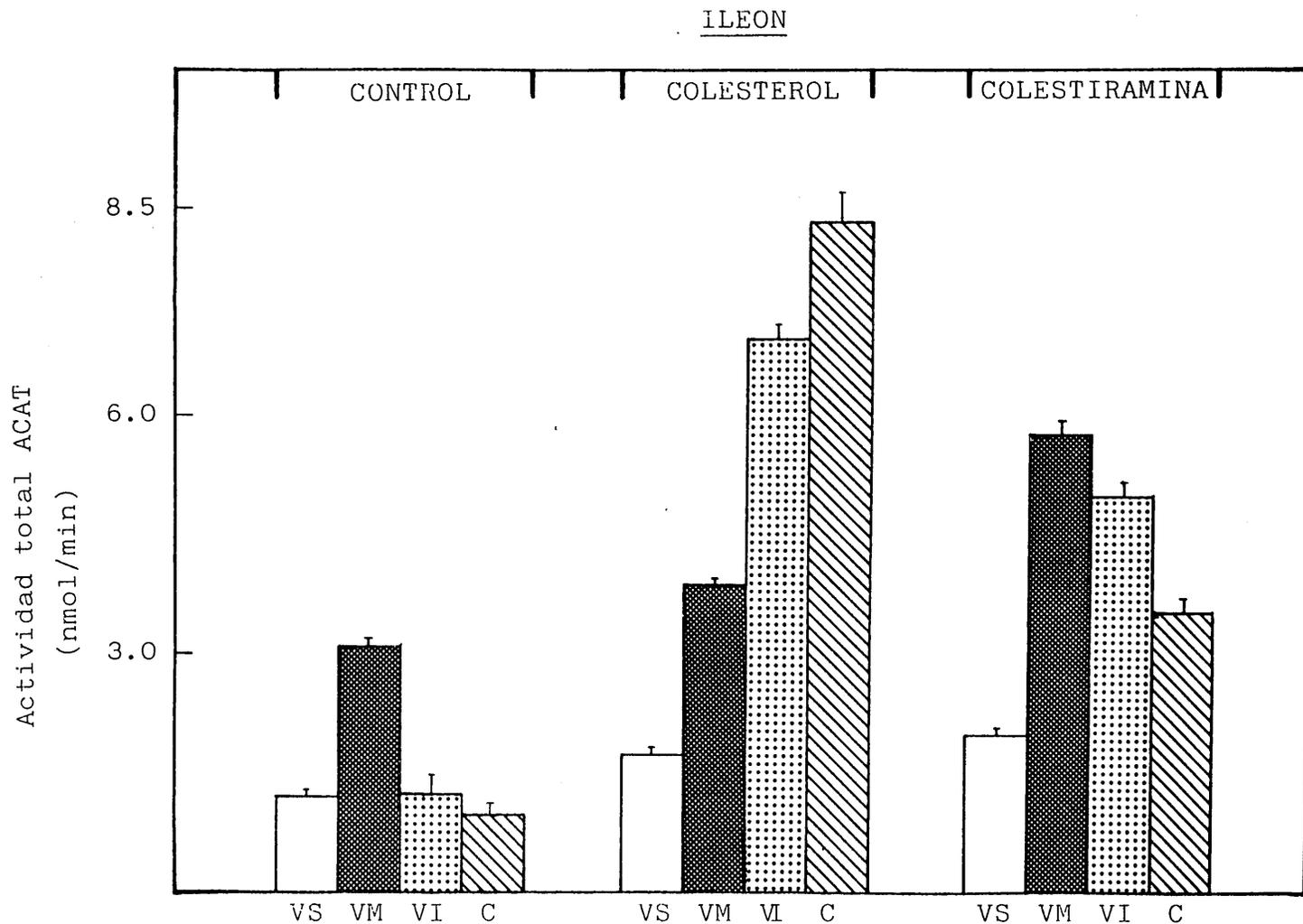


Figura 52.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colcstiramina, sobre la actividad total ACAT de células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosoidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Actividad específica acil-CoA hidrolasa (nmol/mg prot x min)			
Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	5.31 \pm 0.35	6.85 \pm 0.62	9.93 \pm 0.45**
VM	6.54 \pm 0.28	6.91 \pm 0.12	8.99 \pm 0.12**
VI	7.66 \pm 0.52	7.10 \pm 0.25	8.92 \pm 0.30
C	7.17 \pm 0.32	7.19 \pm 0.15	8.76 \pm 0.34*

Tabla 58.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de íleon. - VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y - C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student, respecto a los controles. (*)p<0.05; (**)p<0.01.

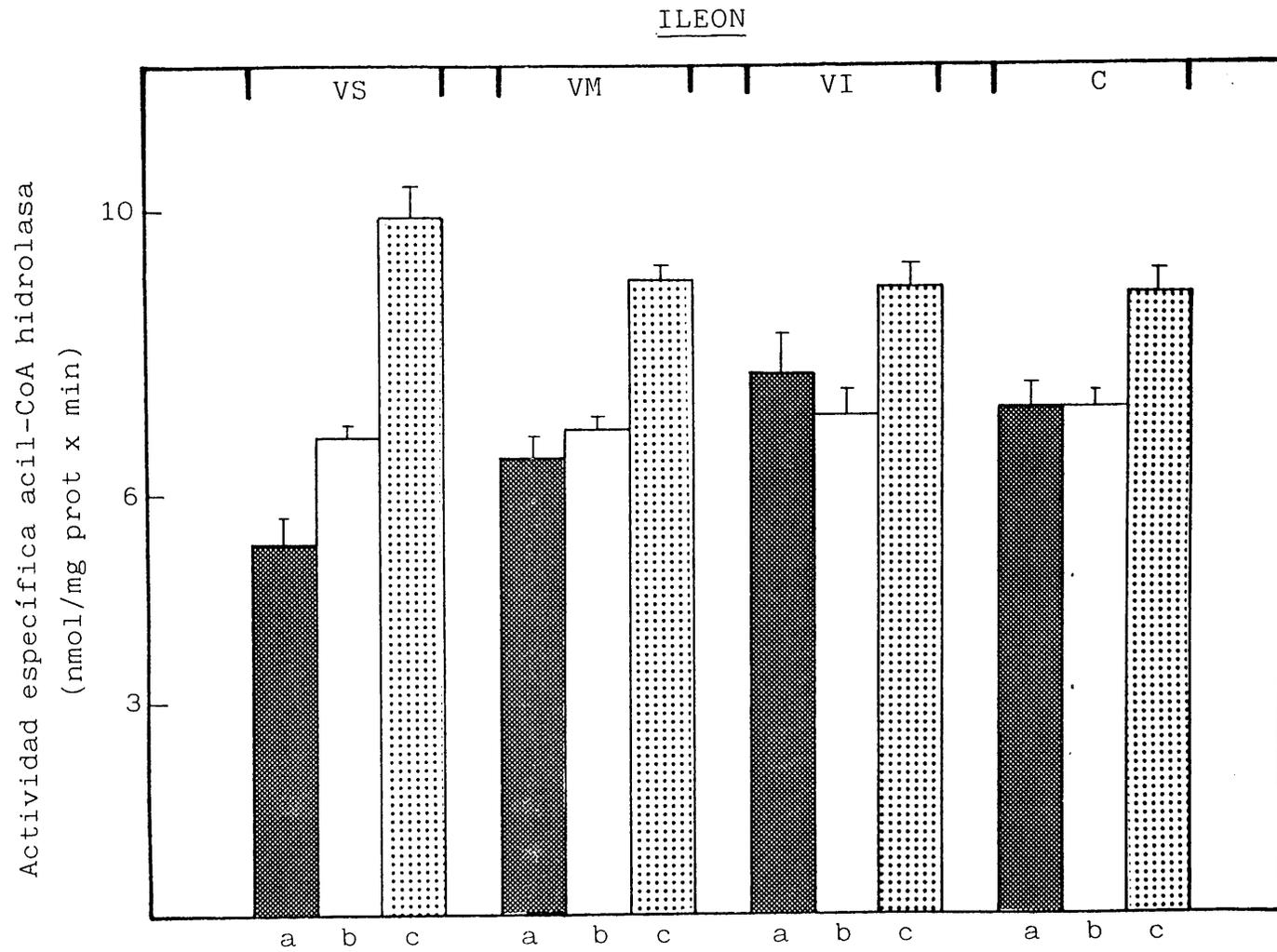


Figura 53.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la actividad específica acil-CoA hidrolasa de células epiteliales aisladas de ileon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

la dieta con colesterol o colestiramina, se ensayó la actividad acil-CoA hidrolasa. Como se muestra en la tabla 58 (fig. 53), los valores determinados cuando la dieta fué suplementada con colestiramina fueron ligeramente más elevados, que los determinados en condiciones control. En cambio, cuando la dieta fué suplementada con colesterol, las variaciones fueron mínimas.

4.I.6.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos

Los valores obtenidos en la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 59 (fig. 54). La suplementación de las dietas con colestiramina produjo ligeros aumentos de la actividad, respecto de los controles, en todas las fracciones celulares estudiadas. La suplementación de la dieta con colesterol, no alteró de modo significativo dicha actividad, frente a lo determinado en los controles.

En la tabla 60 (fig. 55) se muestra la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad total. Los valores más elevados se determinaron, en las dos condiciones estudiadas, en las células inferiores de la vellosidad y en las células de las criptas.

4.I.7.- Efecto sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos.

Los valores determinados, expresados en términos de actividad específica, se muestran en la tabla 61 (fig. 56). En ella se puede apreciar que la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina,

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(pmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	204 ₋ 14	187 ₋ 15	266 ₋ 24
VM	157 ₋ 2	174 ₋ 14	218 ₋ 10**
VI	202 ₋ 33	155 ₋ 33	205 ₋ 14
C	116 ₋ 8	123 ₋ 17	184 ₋ 8 **

Tabla 59.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.p es el nivel de significación de la t de student respecto a los controles (**) $p < 0.01$.

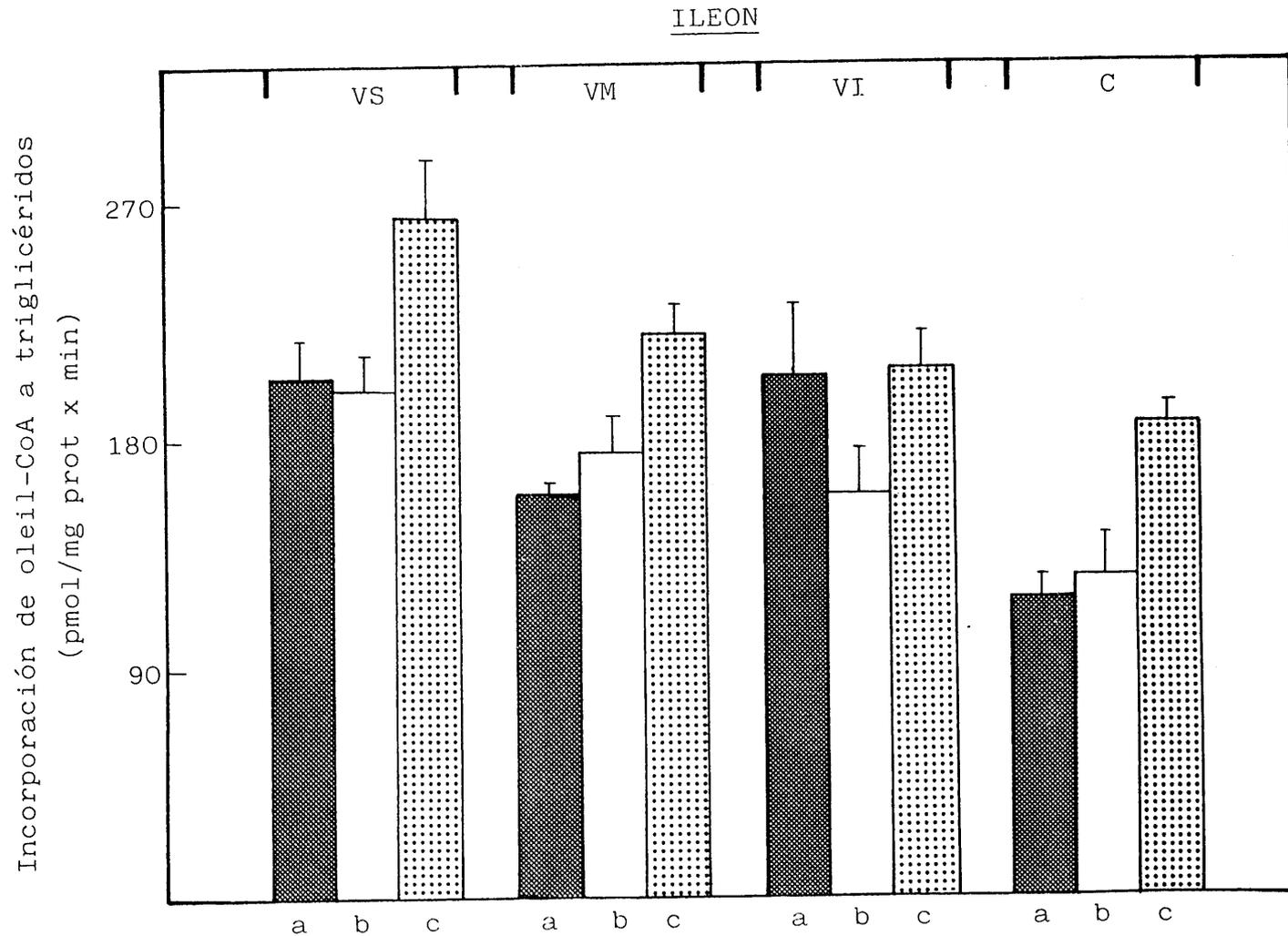


Figura 54.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI: células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a triglicéridos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	1.61 \pm 0.11	0.52 \pm 0.04	1.75 \pm 0.16
VM	2.54 \pm 0.03	1.29 \pm 0.10	4.62 \pm 0.21
VI	2.17 \pm 0.35	2.70 \pm 0.57	4.15 \pm 0.28
C	1.15 \pm 0.08	4.07 \pm 0.42	3.21 \pm 0.14

Tabla 60.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada en términos de actividad total en células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vellosidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

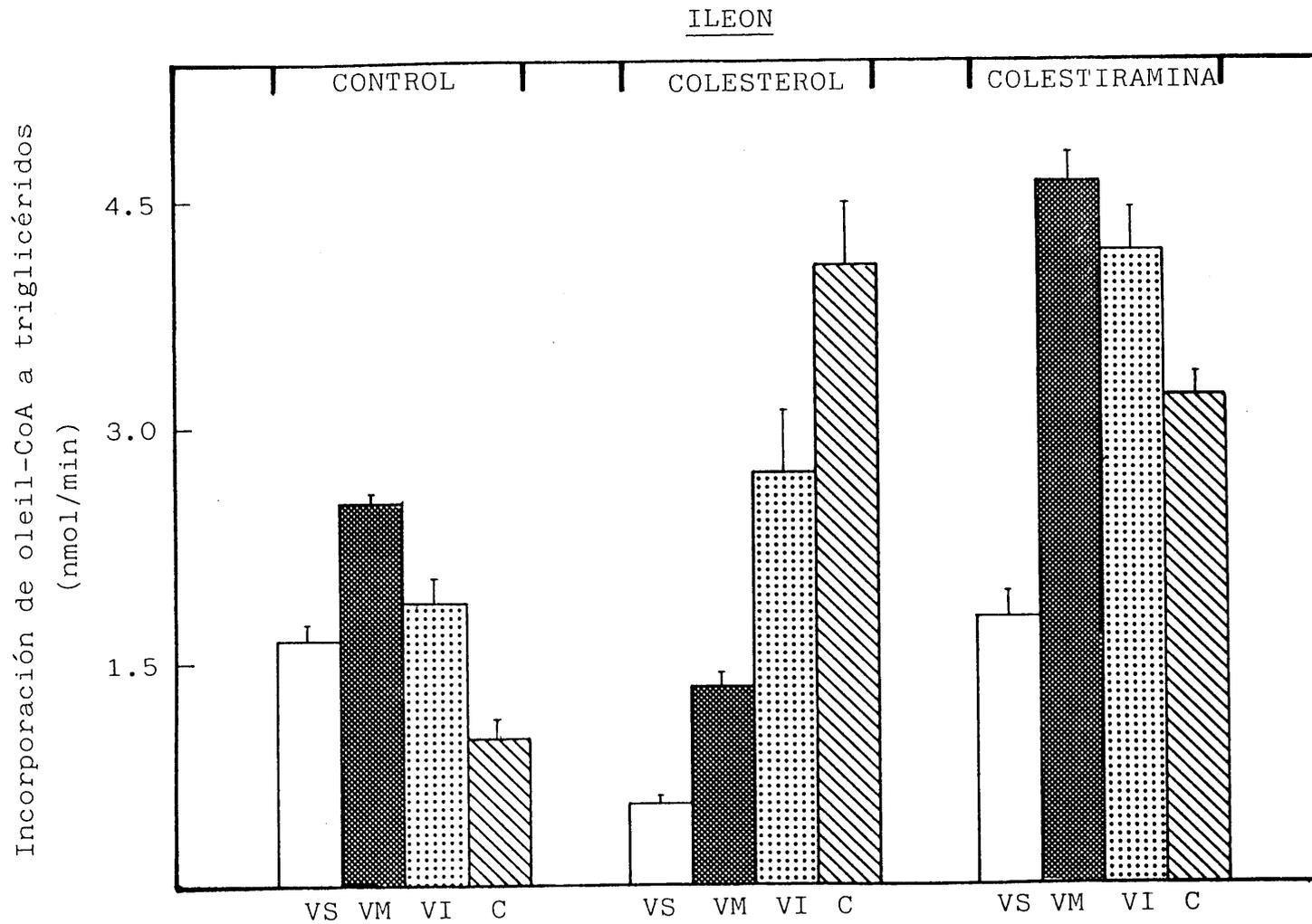


Figura 55.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a triglicéridos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/mg prot x min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	1.28 _± 0.10	1.07 _± 0.02	1.21 _± 0.04
VM	1.61 _± 0.10	1.13 _± 0.11	1.20 _± 0.12
VI	1.29 _± 0.06	1.22 _± 0.09	1.25 _± 0.13
C	1.12 _± 0.08	1.12 _± 0.01	1.14 _± 0.11

Tabla 61.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad específica, en células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vello sidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M. p es el nivel de significación de la t de Student respecto de los controles. (*)p<0.05.

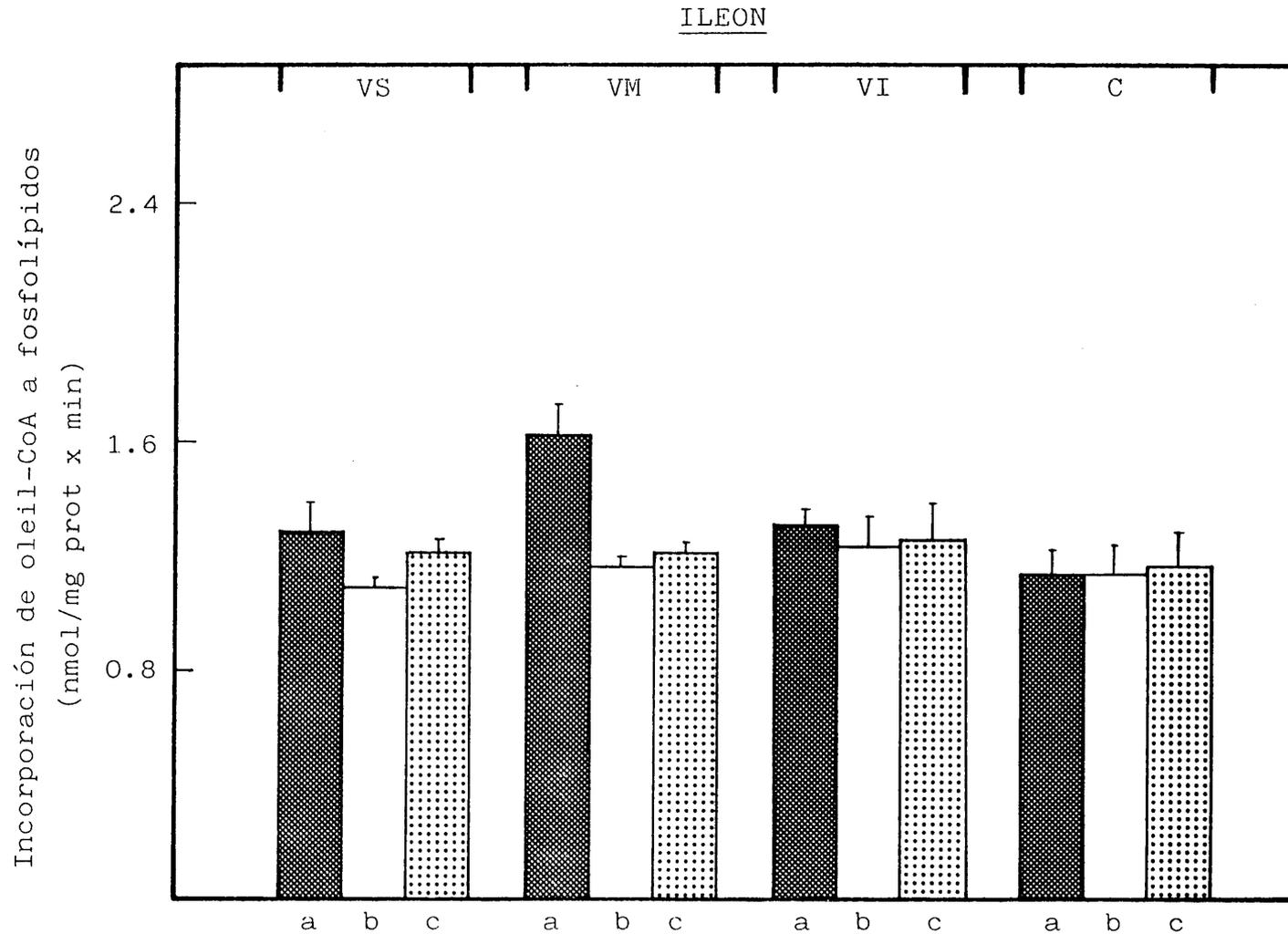


Figura 56.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad específica, en células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. (a)control, (b)colesterol, (c)colestiramina. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.

Incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos
(nmol/min)

Fracción celular	Control	Colesterol	Colestiramina
VS	18.08 \pm 0.78	2.84 \pm 0.07	7.97 \pm 0.29
VM	26.16 \pm 1.70	8.42 \pm 0.08	25.46 \pm 0.42
VI	13.86 \pm 0.65	21.32 \pm 1.60	25.29 \pm 2.69
C	11.18 \pm 0.75	27.99 \pm 2.47	19.86 \pm 1.90

Tabla 62.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, en células epiteliales aisladas de íleon. VS: células superiores de la vello--sidad; VM: células medias; VI: células inferiores y C: células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

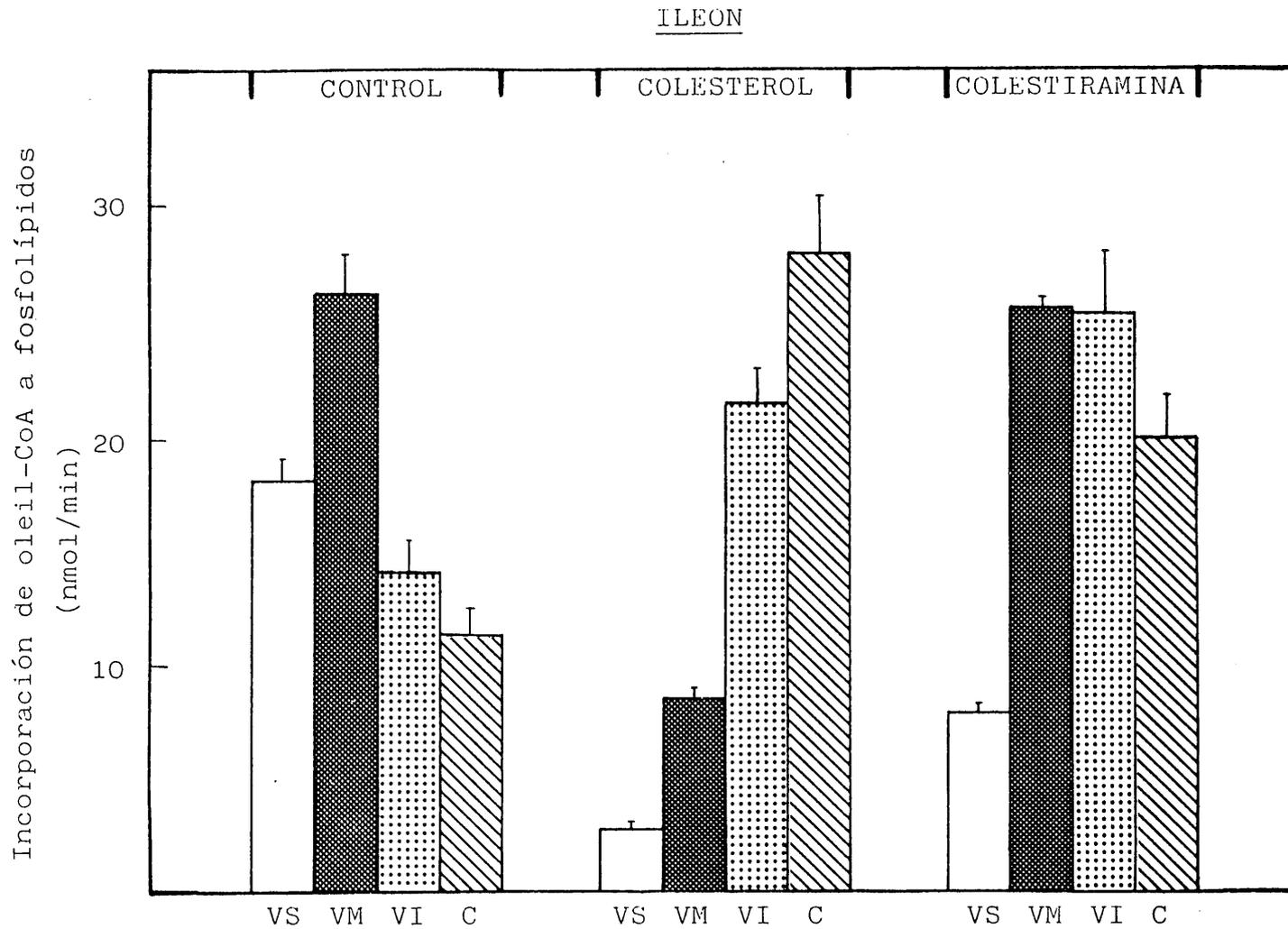


Figura 57.- Efecto de la suplementación de la dieta con colesterol o colestiramina, sobre la incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada como actividad total, en células epiteliales aisladas de íleon. VS:células superiores de la vellosidad; VM:células medias; VI:células inferiores; C:células de las criptas. Los valores se expresan como la media de tres determinaciones \pm S.E.M.

no varía prácticamente las actividades, respecto de - las determinadas en los controles.

La incorporación de oleil-CoA a fosfolípidos, expresada en términos de actividad total, se refleja en la tabla 62 (fig. 57). En las dos condiciones estudiadas, la mínima actividad se determinó en las células superiores de la vellosidad y la máxima en las células de las criptas, cuando la dieta fué suplementada con colesterol, o en las células medias e inferiores de la vellosidad, cuando la dieta fué suplementada con colestiramina.

5.- DISCUSION

Consideraciones generales

El intestino juega un papel central en el metabolismo del colesterol, tanto por ser el sitio en el que se localiza el proceso de absorción de colesterol dietario, como por ser uno de los órganos que contribuye de forma mayoritaria a la síntesis "de novo" del colesterol corporal. La importancia del intestino en la síntesis de esteroides ha sido confirmada reiteradamente por distintos autores (47,52,53). En rata aporta un 24% del total de colesterol corporal (52), pudiendo ser esta fracción, desde un punto de vista cuantitativo, aún más importante en animales como conejo, cobaya, hamster y posiblemente el hombre (19).

A pesar del reconocimiento de las implicaciones del intestino en el metabolismo del colesterol, la información que se posee acerca de la localización y regulación de los procesos de síntesis y absorción es reducida, y en ocasiones controvertida. Esta situación se debe en parte a la existencia de notables diferencias fisiológicas e histológicas, tanto a lo largo del eje longitudinal del intestino, como a lo largo del eje criptas-vellosidades.

Tales diferencias hacen evidente la necesidad de estudios detallados acerca de la contribución relativa que al metabolismo global del colesterol, aportan las distintas regiones anatómicas del intestino, así co

mo los diferentes tipos celulares que lo integran, especialmente de aquellos que se muestran más activos desde el punto de vista colesterogénico, como son las células epiteliales que tapizan la mucosa.

Una dificultad asociada al estudio del metabolismo de esteroides en el intestino, radica en la obtención, de manera poco lesiva, de poblaciones viables de células epiteliales de la mucosa. El desarrollo por parte de Weiser (240) de una técnica que no solo permite obtener por separado células de las criptas y de las vellosidades, sino que desprende las células del eje vellosidades-criptas de una forma secuencial, ha permitido llevar a cabo estudios detallados sobre el metabolismo y función de los distintos tipos celulares aislados.

Así, en un intento de aportar nuevos datos que ayuden a resolver la controversia existente acerca de la distribución y localización de los procesos de síntesis y absorción intestinal de colesterol, en la presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio minucioso de la contribución a estos procesos de cada uno de los distintos tipos celulares aislados por el método de Weiser (240) tanto en duodeno, yeyuno como íleon.

Como animal de experimentación se ha utilizado el pollo, donde los mecanismos de regulación del metabolismo intestinal de esteroides son mal conocidos. Se ha informado que el pollo constituye un modelo ideal para la inducción de niveles elevados de colesterol en suero,

siendo muy sensible a los cambios en el tipo de dieta, y altamente capaz de desarrollar una aterosclerosis experimental.

Por otra parte, mientras que en rata la síntesis máxima de ácidos grasos tiene lugar en el tejido adiposo, en el pollo, de igual modo que en el hombre, esta función es desempeñada por el hígado, por lo que los lípidos allí sintetizados deben ser transportados al tejido adiposo, donde son almacenados (296). Así mismo, las grandes vías metabólicas son semejantes en aves y mamíferos, aunque existen algunas diferencias en los aspectos de regulación endocrina y en las actividades de determinados enzimas considerados individualmente. Todo ello, unido a los datos controvertidos obtenidos en distintos animales a cerca de los mecanismos de regulación que operan en el intestino, así como de la localización exacta de la síntesis y esterificación del colesterol, hacen del pollo un modelo extremadamente válido para la obtención de nuevos datos conducentes al esclarecimiento del modo de control de la absorción, síntesis endógena y esterificación del colesterol en el epitelio intestinal.

En relación con los mecanismos de regulación que operan en el epitelio intestinal, existe un acuerdo general de que determinadas dietas o drogas modifican la velocidad de síntesis o de esterificación del colesterol. Sin embargo, la evidencia obtenida hasta el momento no establece prioridades entre los distintos mecanismos descritos, y los resultados obtenidos difieren según el animal de experimentación utilizado.

El fraccionamiento de la mucosa intestinal ha sido llevado a cabo por diversos investigadores, utilizando distintos sistemas, tales como los denominados métodos mecánicos y métodos bioquímicos. Entre los primeros se incluyen el raspado de la mucosa mediante la utilización de un portaobjetos de microscopio (53), la realización de cortes (150,291) o por vibración de la mucosa invertida, sumergida en distintos tampones (292). Los métodos bioquímicos incluyen digestión enzimática (293) o incubación del intestino en presencia de agentes quelantes tales como citrato (294) o EDTA (295). Los dos últimos métodos emplean sistemas tampón sin proteasas y aseguran un daño mínimo, a diferencia de células fraccionadas mediante cortes o raspado.

La técnica descrita por Weiser (240), basada en la utilización de dos tampones que contienen respectivamente citrato y EDTA, constituye un método de probada utilidad y altamente reproducible para la obtención de fracciones enriquecidas en células de las vellosidades o en células de las criptas. Este método, utilizado inicialmente en rata (240), requiere la exposición del lumen intestinal a los tampones de aislamiento, facilitándose mediante agitación la disgregación de las células epiteliales, que se separan de forma aislada y relativamente intacta del eje de la vellosidad.

Para la utilización de este método de aislamiento de células en pollo, fué necesario modificar la técnica tal como se describió inicialmente, y que supone rellenar la porción de intestino con los tampones de aislamiento. Esta modificación, sugerida por Raul y Col

(278), se hizo necesaria ya que por el método originalmente descrito, solo se producía una liberación parcial de las células epiteliales de la mucosa, como anteriormente habían advertido Stange y Dietschy (150) en yeyuno de rata. Esta variación del método inicial supone la inversión del fragmento de intestino, de forma que las vellosidades queden expuestas hacia el exterior y puedan ser mejor bañadas por los tampones de aislamiento.

Este método provee de células altamente viables, tal y como se ha demostrado utilizando el método convencional de tinción con azul tripán. Así, a lo largo de aproximadamente un periodo de dos horas tras su aislamiento, entre un 90 y 95% de las células de las vellosidades y de las criptas mantienen su integridad, como lo demuestra su capacidad para excluir el colorante vital azul tripán.

En cada una de las distintas fracciones celulares aisladas, se ha medido la activación timidina kinasa (enzima marcadora de las células indiferenciadas de las criptas), la actividad fosfatasa alcalina (enzima marcadora de las células superiores de la vellosidad) y la actividad fosfatasa ácida, que por tener actividad semejante tanto en las células de la vellosidad como en las de las criptas, permite asegurar que las diferencias observadas en la timidina kinasa y fosfatasa alcalina no son debidas a diferencias en la estabilidad celular.

Tanto en duodeno como en yeyuno, el tiempo de incubación necesario para obtener aislados prácticamente la totalidad de los enterocitos del eje de la vellosidad,

ha sido de 160 minutos. En íleon, el tiempo necesario -
fué de 120 minutos. Estos valores son algo superiores
que los 120 necesarios en yeyuno y 80 minutos en íleon
de rata (150). La actividad específica fosfatasa alcali-
na desciende gradualmente en las fracciones celulares -
progresivamente recogidas en las tres regiones de intes-
tino estudiadas, siendo alrededor de 3 veces mas eleva-
da en la fracción inicial recogida en duodeno, que en la
final; unas 5 veces en yeyuno, y alrededor de 14 veces
en íleon. Por el contrario, la actividad específica ti-
midina kinasa aumenta gradualmente en el mismo sentido,
siendo unas 8-9 veces inferior en la primera fracción
celular recogida de duodeno, que la determinada en la -
última fracción; unas 6 veces en yeyuno y alrededor de
5.5 veces en íleon.

Con el objeto de averiguar si las diferencias
de actividad anteriormente mencionadas se debían a posi-
bles alteraciones en la integridad funcional de las cé-
lulas, derivadas del proceso de aislamiento, se ensayó la
actividad fosfatasa ácida, comprobándose que variaba mí-
nimamente a lo largo de todas las fracciones celulares -
aisladas de cada una de las tres regiones estudiadas. -
Atendiendo a la distribución de las enzimas marcadoras,
se han combinado las células obtenidas en cuatro grupos
distintos, denominándose células superiores de la vello-
sidad, medias, inferiores y células de las criptas.

Esta denominación de las poblaciones celulares
aisladas, no debe tomarse en un sentido literal, puesto
que el criterio utilizado quizás no sea un índice exacto
de la localización anatómica de las distintas células.

De acuerdo con Merchant y Heller (151), tal denominación pudiera expresarse de manera mas correcta aludiendo a - "poblaciones celulares enriquecidas" en células superiores de la vellosidad, medias, inferiores o criptas, que es el sentido en el que hemos interpretado la clasificación artificial antes mencionada, de acuerdo con los - distintos valores de actividad timidina kinasa y fosfatasa ácida determinados para cada una de ellas.

Establecimiento de las condiciones óptimas de ensayo de las enzimas estudiadas.

Una vez fijadas las condiciones y el criterio para el aislamiento y clasificación de las distintas poblaciones celulares, y asegurada su viabilidad a corto - plazo, el siguiente paso fué el establecimiento de las - condiciones óptimas de ensayo de las tres enzimas principal objeto de este trabajo, y con un papel fundamental en la síntesis y esterificación del colesterol en el intestino: la HMG-CoA reductasa, la pirofosfomevalonato - descarboxilasa y la acil-CoA: colesterol acil transferasa.

Dado que el plan de trabajo propuesto implicaba la utilización de un elevado número de preparaciones de células intestinales obtenidas de varios animales - distintos, y que habían de ser resuspendidas en volúmenes pequeños de tampón de homogenización, no resultaba factible la realización de la puesta a punto del ensayo de las distintas enzimas consideradas, utilizando fracciones microsomales o citosólicas dependiendo de la enzi

ma en cuestión. Por otra parte, tanto los resultados obtenidos por nosotros y mostrados en la presente Memoria, como los de otros autores (192,196), ponen de manifiesto la dificultad de realizar el subfraccionamiento celular de células epiteliales aisladas de intestino. Estas circunstancias nos han llevado a utilizar como preparaciones enzimáticas en prácticamente todos los casos, homogenados obtenidos mediante sonicación.

El establecimiento de unas condiciones de ensayo exactas y repetitivas, era condición previa para la obtención de resultados concluyentes. Con tal objeto se han realizado una serie de experimentos encaminados a evaluar el efecto de la concentración proteica y el tiempo de incubación sobre las distintas actividades enzimáticas estudiadas, así como la distribución intracelular de las enzimas previamente mencionadas.

En el ensayo de la HMG-CoA reductasa, se ha utilizado básicamente el método descrito por Shapiro y Col (245), basado en la cuantificación, en su estado de lactona, de todo el ácido mevalónico originado en la reacción, a partir de ^{14}C -HMG-CoA, sin necesidad de su extracción con éter. Las variaciones descritas en la bibliografía para la actividad HMG-CoA reductasa, no solamente resultan imputables a las distintas condiciones fisiológicas sino que parece haberse demostrado una notable influencia del sistema de preparación enzimática, especialmente del tampón de homogenización. De acuerdo con trabajos previos realizados en nuestro Departamento, hemos introducido las ligeras modificaciones por ellos -
apuntadas. Así, la zona de Rf raspada en la placa de -

cromatografía ha sido de 0.3-0.7, frente al 0.6-0.9 descrito en la bibliografía (245).

Para el establecimiento del margen de linealidad entre el tiempo de incubación y la cantidad de MVA formado, manteniendo fijas el resto de las condiciones, especialmente la concentración de sustrato y cofactores presentes, se han ensayado distintos tiempos que abarcan de 10 a 60 minutos, comprobándose que dicho margen de linealidad se mantiene hasta los 30 minutos, frente a los 60 minutos a los que se conserva la proporcionalidad en hígado (246). De la misma manera, se ha establecido la proporcionalidad entre la cantidad de proteína enzimática presente en el medio de incubación y el MVA formado. Entre el margen ensayado (0.1-0.4 mg), la proporcionalidad se ha mantenido hasta los 0.3 mg, frente a los 0.4 mg en hígado, o los 0.6 mg en mucosa raspada de intestino (246) en las mismas condiciones estándar.

Aunque la localización microsomal de la HMG-CoA reductasa hepática ha sido reiteradamente comprobada, la localización subcelular de la enzima intestinal está sujeta a controversia, habiendo postulado algunos autores una localización doble (microsomal y mitocondrial) de la enzima (151, 192). De cualquier manera, el estudio minucioso llevado a cabo por Field y Col (196) parece demostrar sobradamente que esta doble localización se debe a deficiencias en el proceso de aislamiento, puesto que la utilización de métodos más sofisticados pone de manifiesto la localización preferentemente microsomal de la enzima, siendo muy baja o prácticamente nula la detectada en la fracción mitocondrial.

También en el caso del pollo el fraccionamiento subcelular de la célula intestinal es difícil, no disponiéndose de ningún método sencillo que permita aislar los distintos orgánulos con un alto grado de pureza. En el presente trabajo el subfraccionamiento celular se ha realizado por centrifugación diferencial en el tampón de homogeneización, siendo la distribución de la actividad de un 20% en la fracción nuclear, un 30% en la fracción mitocondrial, un 49% en la microsomal y un 1% en la citosólica. Por consiguiente, también en este caso, el intento de asociar la actividad reductasa a una fracción subcelular determinada no resultó concluyente. Es posible que la contaminación cruzada entre orgánulos, debida al mucus u otros factores, sea difícil de eliminar en el proceso de subfraccionamiento de células intestinales. De cualquier manera el objeto de estos experimentos era en primer lugar el de establecer la validez de utilizar los datos obtenidos en homogenados como valor representativo de la actividad enzimática.

En un trabajo realizado por Sugano y Col (276), se indica que en ausencia de un inhibidor de los enzimas proteolíticos, la actividad HMG-CoA reductasa de células epiteliales de la vellosidad intestinal, es prácticamente indetectable, y que la inclusión en el tampón de homogenización de un inhibidor de la tripsina produce una activación de la enzima. Esta activación parece ser específica para el caso del inhibidor de la tripsina, careciendo de efecto otros inhibidores de proteasas (276). Dado que estas primeras observaciones fueron realizadas en preparaciones celulares obtenidas por el método de raspado de la mucosa, se ha investigado el posible efecto producido por la inclusión de un --

de un inhibidor de la tripsina en el tampón de homogenización, sobre la actividad reductasa de mucosa raspada de pollo, y sin embargo no se han detectado diferencias significativas entre preparaciones obtenidas en ausencia y presencia del inhibidor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en rata (192), y co como consecuencia, en experiencias posteriores, se ha o mitido el inhibidor en el tampón de homogenización.

Es de destacar la baja actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en células aisladas de intestino de pollos de 30 días, con respecto a la de hígado (246) y a la intestinal de pollos entre una y dos semanas de edad (246). De cualquier forma, a lo largo del desarrollo postnatal, la actividad HMG-CoA reductasa intestinal muestra un claro descenso a partir del día 15. Los valores observados por tanto en los pollos utilizados en este estudio, están de acuerdo con el patrón de desarrollo de la reductasa intestinal.

La actividad PPMVA descarboxilasa se ha ensayado según el método de Slakey y Col (244), con ligeras modificaciones. El método está basado en la medida de los alcoholes formados tras la hidrólisis de los productos de reacción por actuación de la fosfatasa alcalina. El método de extracción de los alcoholes formados, se ha modificado empleando éter etílico en sustitución del éter de petróleo como disolvente. Con este procedimiento se consigue un rendimiento en la extracción de un 90% , frente al 20% obtenido con éter de petróleo.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de ensayo en células aisladas, se han realizado una

serie de experiencias encaminadas a evaluar el efecto de la concentración de proteínas presente en la mezcla de incubación, así como del tiempo de incubación sobre la descarboxilación del ácido pirofosfomevalónico, manteniendo constantes el resto de las condiciones, especialmente la concentración del sustrato.

La proporcionalidad entre el tiempo de incubación y los productos formados se mantuvo en toda la banda de tiempos estudiada (0-60 min). De la misma forma, dicha proporcionalidad también se mantuvo a lo largo de todo el rango de la concentración proteica ensayada (0-0.3 mg). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores en distintos orígenes. Así, en riñón, hígado y mucosa raspada de intestino de pollo, la linealidad se mantuvo hasta 120 min y 2 mg de proteína (252).

Aunque es bien sabido que la PPMVA descarboxilasa es una enzima soluble, hemos medido su actividad en las diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. Prácticamente la totalidad de la actividad se recogió en la fracción citosólica, siendo la actividad específica alrededor de 4 veces superior a la determinada en el homogenado completo. De cualquier manera, a fin de establecer un criterio único con vistas a la posterior interpretación de resultados, en experiencias posteriores se ha utilizado como extracto enzimático para el ensayo de la actividad descarboxilasa, homogenados de células.

Establecidas las condiciones óptimas para el ensayo de la HMG-CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa, se ha llevado a cabo la puesta a punto de la enzima ACAT

en enterocitos aislados.

Aparte del papel esencial del intestino en los procesos de absorción y síntesis, también actúa como lugar de transformación del colesterol para su posterior transporte a los distintos tejidos del organismo. Este proceso implica la esterificación de la molécula de colesterol y su incorporación a quilomicrones. Se ha descrito la existencia de dos sistemas mayoritarios para la esterificación del colesterol procedente del lumen intestinal: la colesterol esterasa y la acil-CoA: colesterol acil transferasa. La colesterol esterasa es una enzima soluble que cataliza la esterificación del colesterol con un ácido graso libre, a un pH óptimo de 6.2, y es de origen pancreático (297). La ACAT es una enzima microsomal que cataliza la esterificación del colesterol con un acil-CoA y presenta un margen de pH óptimo bastante amplio (298).

Resultados obtenidos con las dos enzimas sugieren que ambas presentan una función importante en la esterificación del colesterol en el intestino, y aunque se ha establecido un papel preponderante para la ACAT (299), la importancia relativa de cada una de ellas, aún no es del todo clara. Pruebas recientes parecen sugerir que la colesterol esterasa pancreática tiene una función importante en el proceso de hidrólisis de los ésteres de colesterol y su posterior entrada a través del borde en cepillo del enterocito (254), más que en la esterificación intracelular (300), sugiriendo que su presencia en el interior de la célula pueda ser resultado de la contaminación de preparaciones celulares con el contenido del lumen intestinal. De cualquier manera, el presente estudio se ha centrado en torno a la ACAT, in-

tentando establecer las variaciones que se producen en su actividad, bajo distintas condiciones fisiológicas.

La mayoría de los métodos utilizados en la actualidad para determinar la actividad ACAT, usan como sustrato exógeno un ^{14}C -acil-CoA graso, y no el ^{14}C -colesterol, ya que se desconoce en qué grado este colesterol entra a formar parte de los diferentes "pools" celulares. Puesto que la disponibilidad del colesterol de cada uno de estos "pools" para ser sustrato de la ACAT, es muy variable, los valores absolutos de la actividad de dicha enzima no podrían ser calculados con exactitud.

En el presente trabajo se ha utilizado para determinar la actividad ACAT básicamente el método de Goodman (248), y como sustrato exógeno el ^{14}C -oleil-CoA, a una concentración tal que el oleil-CoA endógeno es insignificante con respecto a la concentración del ácido graso añadido al medio de reacción. Este sustrato es también utilizado por la acil-CoA hidrolasa, así como para su incorporación a fosfolípidos y triglicéridos (248), razón por la que lo hemos utilizado también para medir su incorporación a estos dos últimos compuestos.

La actividad acil-CoA hidrolasa ha mostrado ser muy superior a la exhibida por la ACAT, tanto en intestino como en otros tejidos (265,281). Dado que la hidrólisis del ^{14}C -oleil-CoA para formar ^{14}C -oleico es tan elevada, y lo que es más importante, puede variar en las distintas condiciones de estudio o fracciones celulares ensayadas, en todas las experiencias del presente trabajo hemos medido de forma rutinaria dicha actividad hidrolasa.

En la puesta a punto del método, se han determinado el tiempo óptimo de incubación, así como la concentración de proteína enzimática con la que se mantiene la proporcionalidad con el producto formado. El establecimiento de los valores óptimos de otros parámetros, tales como pH, concentración de DTT, concentración de albúmina y de sustrato, se han establecido en un trabajo previo realizado en nuestro Departamento (273).

En los márgenes de tiempo estudiados (1-10 min), la linealidad de la reacción se mantuvo hasta los 2 min, frente a los 10 min ó 20 min descritos en hígado y cerebro de pollos jóvenes, respectivamente, cuando se usa palmitoil-CoA como sustrato (273,316). El palmitoil-CoA parece ser un sustrato mas pobre para la ACAT que el oleil-CoA, y de ahí que en general necesite mayores tiempos de incubación. Además, el corto margen de linealidad de la reacción puede ser debido a una limitación, bien en la concentración de sustrato exógeno, o bien en la de colesterol endógeno microsomal. De hecho, diversos autores han indicado que el "pool" de colesterol microsomal que actúa como sustrato de la ACAT es muy limitado, como indica el que la adición de colesterol al medio de reacción aumenta la actividad ACAT, así como el tiempo de linealidad en la formación de ésteres de colesterol (277).

Se ha estudiado también la linealidad de la reacción frente a diferentes concentraciones de proteína enzimática, manteniéndose dicha proporcionalidad a lo largo del margen ensayado (0.1-0.4 mg). Análogos resultados se han obtenido en hígado y cerebro de pollo, donde la proporcionalidad se ha mantenido hasta 0.3 y 0.4 mg

respectivamente (273,316).

En el estudio de la actividad ACAT en las diferentes fracciones subcelulares, se ha encontrado, igual que con la HMG-CoA reductasa, una gran dispersión de actividad entre las distintas fracciones separadas. Esto no debe ser interpretado en el sentido de que la ACAT sea una enzima de localización múltiple, pues está sobradamente demostrado que se trata de una enzima microsomal, sino mas bien como un hecho que vuelve a poner de manifiesto la dificultad de realizar un buen subfraccionamiento en células de mucosa intestinal (196,277).

Distribución de los procesos de síntesis y esterificación del colesterol a lo largo del intestino.

Como anteriormente hemos indicado, la estructura anatómica y fisiológica del intestino es compleja, con notables diferencias en la morfología y función de sus células, tanto horizontalmente a lo largo de su longitud, como verticalmente a lo largo del eje de la velocidad. A fin de establecer si estas diferencias se corresponden con variaciones en el metabolismo del colesterol, se ha estudiado en primer lugar la distribución de las distintas actividades enzimáticas, índices por una parte de la velocidad de síntesis de colesterol (HMG-CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa) y, por otra parte, de la velocidad de esterificación (ACAT). A continuación se ha establecido el contenido en colesterol de las distintas fracciones intestinales obtenidas, así como la velocidad de síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, todo ello a lo largo del intestino, en las tres

regiones consideradas, duodeno, yeyuno e íleon, y a lo largo del eje vellosidad-cripta.

A lo largo del intestino, la actividad HMG-CoA reductasa se localiza predominantemente en la zona media y distal, es decir en yeyuno e íleon, tanto cuando se representa en términos de actividad específica, como cuando se considera la actividad total, es decir en función de la cantidad de proteína aislada en cada una de las fracciones obtenidas. Esta situación concuerda parcialmente con las observaciones realizadas por Dietschy y Siperstein (53) y Shefer y Col (197), quienes establecen que la máxima actividad biosintética en rata corresponde a la zona de íleon, siendo considerablemente más baja en el duodeno distal y yeyuno. En nuestro caso sin embargo, el yeyuno también presenta una considerable actividad HMG-CoA reductasa. Es de destacar que en conejo (281) la actividad reductasa es considerablemente más baja en íleon que en yeyuno, lo cual pone de manifiesto una vez más las diferencias entre el metabolismo de colesterol intestinal, dependiendo de la especie estudiada. La información que se posee en el hombre indica una elevada actividad reductasa en la mucosa gástrica, mientras que la actividad es baja y prácticamente constante a lo largo del intestino delgado y colon (301).

Así mismo, en mucosa raspada de pollo, la máxima actividad específica HMG-CoA reductasa corresponde a la zona de yeyuno e íleon, siendo aproximadamente el doble que la detectada en duodeno. Sin embargo los valores de actividad específica obtenidos en raspados de mucosa son considerablemente inferiores a los obtenidos en células aisladas. En este sentido se ha señalado que

el empleo de métodos mecánicos para el aislamiento de células de la mucosa intestinal, provoca daños considerables en los enterocitos así obtenidos (152). Además, el método de raspado, posiblemente junto con los enterocitos aisle células procedentes del corion y "muscularis mucosae", de poca o ninguna actividad reductasa, dando lugar a actividades específicas inferiores. De cualquier manera, las profundas diferencias en actividades específicas obtenidas por ambos métodos, pone de manifiesto las ventajas de la utilización de métodos bioquímicos para el aislamiento de células del epitelio intestinal.

En cuanto a la distribución de la reductasa a lo largo del eje vellosidad-cripta, la zona de máxima actividad parece corresponder a la zona superior de la vellosidad, siendo esta situación más patente cuando se examinan las actividades reductasa totales de duodeno y yeyuno. En general los datos obtenidos apoyan la idea de que las células de la vellosidad son al menos tan activas en la síntesis de colesterol como las de las criptas.

Los estudios de Dietschy y Siperstein (161) y Shefer y Col (197) en mucosa raspada, y por otra parte de Panini y Col (192) en células aisladas por el método de Weiser, indican que las células indiferenciadas de las criptas serían las que presentarían la máxima actividad de síntesis, en tanto que las células maduras de la vellosidad serían relativamente inactivas. En cambio en el trabajo de Muroya y Col (152), donde se ha medido la capacidad de síntesis por tres métodos distintos que incluyen incubación de células raspadas, incubación de

porciones completas de intestino antes de realizar el raspado, y experimentos en los que se ha efectuado el raspado por distintos métodos, se establece que ambas fracciones tienen una capacidad similar para sintetizar esteroides precipitables con digitomina (DPS). Finalmente Stange y Col (184), midiendo la incorporación de agua tritiada a DPS, informan que en la fracción proximal del intestino de rata, aumenta ligeramente la actividad de síntesis de esteroides en el sentido vellosidades-criptas, pero en cambio en el íleon, son las fracciones de la vellosidad las que muestran la máxima actividad.

A esta diversidad de observaciones se unen los resultados obtenidos por Merchant y Heller (151) en íleon de rata, utilizando el método de aislamiento de Weiser, y que establecen que las células superiores de la vellosidad son las de máxima actividad HMG-CoA reductasa.

Nuestros resultados por tanto parecen coincidir con estas últimas observaciones realizadas en rata, así como los obtenidos por Stange y Col (281) en íleon de conejo, que establecen que la máxima actividad biosintética de colesterol corresponde a la zona superior de la vellosidad intestinal.

Como se ha indicado, nuestro estudio en torno a la localización y regulación de la biosíntesis de colesterol en la mucosa intestinal, se ha centrado, además de en HMG-CoA reductasa, en otra enzima, la PPMVA descarboxilasa. El interés de esta última está basado en la sugerencia de que la descarboxilación del ácido mevalónico aparece como un punto de control en la biosíntesis de esteroides, bajo determinadas condiciones fisiológicas.

cas (229). La existencia en intestino de pollo ha sido puesta de manifiesto previamente (233), aunque la distribución de la actividad entre las distintas zonas del intestino delgado, así como a lo largo del eje de la vellosidad, aún no ha sido descrita.

En células epiteliales aisladas de intestino de pollo, la máxima actividad específica descarboxilasa -al igual que la HMG-CoA reductasa- se localiza en el íleon y yeyuno, siendo ligeramente inferior en la zona del duodeno. La máxima actividad específica corresponde a las células de las criptas, pero por el contrario, cuando se consideran actividades totales, es decir teniendo en cuenta la cantidad de proteína recogida en cada fracción, son las células superiores y medias de la vellosidad las que contribuyen de forma mayoritaria a la formación de unidades isopreno.

Numerosas observaciones sugieren que las células apicales de la vellosidad están especializadas en el transporte del colesterol de nueva síntesis (302,303). El retículo endoplasmático está más desarrollado en las células de la vellosidad y presumiblemente también es dónde se produce de forma mayoritaria la esterificación del colesterol en la mucosa intestinal. Además, existen diferencias morfológicas y funcionales entre las células de las criptas y las de las vellosidades, caracterizándose estas últimas por su elevado metabolismo y capacidad de oxidación de ácidos grasos, aminoácidos y azúcares. Todo ello quizás puede justificar la elevada actividad biosintética, reflejada por las actividades totales de las dos enzimas estudiadas, observada en las células apicales de la vellosidad.

Tanto la absorción de nutrientes como la formación de quilomicrones, tienen lugar predominantemente a través de las células superiores de la vellosidad. Dado que el colesterol es un constituyente de lipoproteínas, cabe esperar que en condiciones de una dieta exenta de colesterol, las células superiores de la vellosidad muestran una tasa elevada de síntesis de colesterol. Al mismo tiempo, el mantenimiento de una relativamente elevada velocidad de síntesis en las células de las criptas también sería necesaria para abastecer las necesidades derivadas de la intensa actividad mitótica que muestran estas células.

Una vez definida la distribución de dos de las enzimas implicadas en la biosíntesis de esteroides, se ha establecido la localización de la enzima ACAT, en el epitelio intestinal, teniendo en cuenta que la esterificación se considera como un punto de control en el proceso de absorción del colesterol luminal.

La primera evidencia acerca de la existencia de una enzima coenzima A dependiente, capaz de catalizar la esterificación del colesterol en el epitelio intestinal, fué presentada por Haugen y Norum en 1976 (264). - Desde entonces, su presencia en la mucosa intestinal de una amplia gama de especies ha sido puesta de manifiesto repetidamente (260,304,305).

En relación con la distribución de esta enzima en la mucosa intestinal, y frente a la controversia - existente acerca de la localización de la HMG-CoA reductasa, parece existir un acuerdo general de que la ACAT se localiza mayoritariamente en la zona proximal del inte

testino. Así, en rata (264) y en hombre (265), aparece un gradiente de actividad específica ACAT desde la región proximal del intestino hacia la zona distal, mostrando la actividad más elevada la porción proximal de yeyuno y la mas baja en el duodeno y en el íleon; en cambio en conejo la máxima actividad se desplaza hacia la región media (266).

En el caso del pollo, de las tres regiones estudiadas, el yeyuno es la que presenta la actividad específica más elevada, alrededor de 3 veces superior a la de íleon y de 1.5 a 2.5 a la de duodeno. Esta situación cambia ligeramente cuando se consideran actividades totales, apareciendo tanto el duodeno como el yeyuno con una alta actividad ACAT. Es de destacar que esta distribución longitudinal de la actividad ACAT refleja el lugar de máxima absorción intestinal de colesterol (27). Dado que se ha descrito que la toma de LDL a lo largo del eje intestinal es un proceso relativamente uniforme (183), estos datos estarían de acuerdo con la idea de que la ACAT participa fundamentalmente en los procesos de esterificación del colesterol absorbido, mas que en el del colesterol endógeno.

Al examinar su distribución a lo largo del eje vellosidad-cripta, se observa en yeyuno que la máxima actividad corresponde a las células superiores y medias de la vellosidad, aunque estas diferencias son poco aparentes en las zonas intestinales de menor actividad. La localización predominante de la actividad ACAT en la zona superior de las vellosidades también parece ser un hecho ampliamente comprobado. En estudios realizados en rata (184,270), un 90%, tanto de la actividad específica como

de la total, aparecen en la fracción de las células de la vellosidad (superiores, medias e inferiores).

Dado que el acil-CoA también es sustrato de la acil-CoA hidrolasa, enzima de elevada actividad específica y que puede competir con ACAT en la utilización del sustrato, se ha medido su actividad de forma rutinaria siempre que se determinaba actividad ACAT, encontrando que su actividad es similar en todas las fracciones ensayadas, lo cual permite asegurar que las variaciones en actividad ACAT no son debidas a diferencias en la disponibilidad de sustrato.

En resumen, se puede establecer que existe una distribución inversa en cuanto a la localización de la actividad HMG-CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa por una parte, y la actividad ACAT por otra. Mientras que la primera se encuentra predominantemente en la zona distal del intestino, la ACAT se localiza en la porción proximal, lugar de absorción del colesterol luminal. En cuanto a la distribución de la actividad PPMVA descarboxilasa, en términos de actividad específica, el patrón general encontrado concuerda con el de la reductasa a lo largo del intestino. Sin embargo, la mayor actividad en criptas es contrario a las observaciones realizadas en la reductasa. Esta aparente disociación entre la distribución de la actividad reductasa y descarboxilasa, ambas implicadas en el proceso de biosíntesis de esteroides, es interpretable, considerando el papel de la PPMVA descarboxilasa en el metabolismo del ácido mevalónico. Así, se ha demostrado en cultivos de mucosa intestinal de conejo (306), y en intestino humano (162), la existencia de una elevada actividad del "shunt" del MVA, convirtiendo el

ácido mevalónico a ácidos grasos. La importancia relati
va del intestino en este desvío metabólico del MVA ha si
do también demostrada recientemente en nuestro Departa-
mento en embrión de pollo de 19 días (315). Por otra -
parte, una disociación entre la actividad reductasa y la
PPMVA descarboxilasa, ha sido descrita en ocasiones -
previas (251).

Se ha relacionado una baja actividad HMG-CoA re
ductasa, y por tanto también una baja actividad coleste-
rogénica, con una elevada concentración de colesterol en
las células de la mucosa intestinal (53,152). Con estas
observaciones en mente, se ha realizado así mismo un -
estudio de los niveles de colesterol, tanto total como -
libre, en distintas fracciones del epitelio intestinal
obtenidas por el método de Weiser. Sin embargo, nuestros
resultados indican que los niveles de colesterol son -
semejantes en todas las fracciones celulares aisladas -
de las tres regiones de intestino estudiadas, excepto -
en íleon, donde el contenido en colesterol, expresado -
en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, es ligeramente superior al de duo-
deno y yeyuno.

Por otra parte, prácticamente todo el colestere
rol está en forma libre, y teniendo en cuenta que la ma
yor parte de la absorción intestinal de colesterol en -
el pollo, en condiciones de una dieta baja en esteroides
tiene lugar en la porción proximal (307), es posible que
una elevada proporción del contenido de colesterol del
íleon, sea sintetizado "in situ". Esta idea estaría de
acuerdo con el concepto de que la concentración celular
de esteroides determina la velocidad de biosíntesis y ac
tividad de la HMG-CoA reductasa (308). Por consiguiente

una baja absorción a nivel de íleon daría lugar a una - alta actividad reductasa, a fin de asegurar los niveles de colesterol necesarios para los requerimientos de esta zona de intestino. En el mismo sentido, es de destacar que se ha descrito que la mayoría del colesterol sintetizado "in situ" en el enterocito, se encuentra almacenado en forma libre (306).

En el pollo, a diferencia de la rata, la dieta estándar está constituida en su mayoría por hidratos de carbono, siendo muy bajo el contenido en grasas, y prácticamente nulo el contenido en colesterol. Si se asume que la mayor parte del colesterol de la mucosa intestinal en pollos alimentados con una dieta estándar, proviene de la síntesis, y por otra parte que la utilización de colesterol para la formación de lipoproteína es máxima en duodeno y yeyuno, resulta comprensible que el íleon, zona de máxima actividad colesterogénica, y mínima formación de lipoproteínas, presente un elevado contenido en colesterol.

Finalmente, en relación con la síntesis de - triglicéridos y fosfolípidos acil-CoA dependiente a lo largo del epitelio intestinal, destacar que al igual que en el caso de la ACAT, la máxima actividad corresponde a la zona proximal y media (duodeno y yeyuno). En cuanto a su distribución a lo largo del eje vellosidad-cripta, también corresponde claramente a la zona superior de la vellosidad la máxima actividad. La existencia de diferencias entre vellosidades y criptas en la velocidad de biosíntesis de fosfatidilcolina y en la acilación a diacilglicéridos, que había sido descrita en rata por Mansbach en 1973 (137), apoya el hecho de que la absorción

y resíntesis de triglicéridos tiene lugar mayoritaria--
mente a nivel de las células más apicales de la vellosi-
dad, para ser allí utilizadas en la formación de quilo-
micrones o VLDL como ocurrirá en el caso del pollo.

Efecto de distintas dietas sobre la síntesis y esterifi- cación del colesterol a lo largo del intestino.

A fin de examinar detalladamente los mecanis-
mos implicados en la regulación de la síntesis y esterifi-
cación del colesterol en el intestino, se han realizado
asi mismo una serie de estudios en células aisladas
por el método de Weiser (240), en los que se ha manipu-
lado, mediante alimentación con distintas dietas, el flujo
normal de colesterol desde el lumen hacia la mucosa
intestinal.

Los experimentos realizados han sido encaminado
s a evaluar minuciosamente los niveles de síntesis de
esteroles -reflejados por la actividad HMG-CoA reducta-
sa- y de esterificación coenzima A dependiente, bajo dis-
tintas condiciones fisiológicas. Así, mediante el empleo
de distintas dietas se ha manipulado tanto la entrada de
colesterol a través del borde en cepillo del enterocito,
como el contenido de colesterol necesario para la síntesis
de lipoproteínas.

Mientras que en hígado está suficientemente -
demostrado que el colesterol de la dieta regula su pro-
pia síntesis, la modulación de la síntesis intestinal de
colesterol por el colesterol intraluminal, es un tema -
sujeto a controversia.

Estudios realizados en rata (184), mono (160) y hombre (95), han sugerido que el colesterol de la dieta no tiene un efecto significativo sobre la colesterogénesis intestinal. Sin embargo, otros autores han encontrado una clara supresión de la síntesis intestinal por el colesterol en animales como cobaya (94), perro (148), pollo (290), conejo (281), e incluso rata (165), poniendo de manifiesto que la acción inhibidora del colesterol dietario sobre la colesterogénesis intestinal es mas pronunciada en aquellos animales susceptibles a la inducción de una hipercolesterolemia experimental (cobaya, pollo, conejo).

Estos resultados aparentemente contradictorios indujeron a pensar que quizás el intestino, con respecto al metabolismo del colesterol, se comporta como un órgano pasivo encargado exclusivamente de absorber y "empaquetar" el colesterol de la dieta, para enviarlo hasta el hígado, donde sería utilizado para satisfacer sus propias necesidades, para formar parte de las distintas lipoproteínas, o ser convertido a ácidos biliares. Sin embargo, es adecuado pensar que dada la importancia de su contribución relativa a la síntesis global de colesterol corporal, debe poseer mecanismos que le permitan controlar su propia síntesis en función, tanto de las condiciones dietarias, como de sus propias necesidades o las del resto de los tejidos.

Como anteriormente hemos mencionado, la tasa de síntesis de colesterol es regulada en muchos tejidos a través de un mecanismo "feed-back" por el propio colesterol. Esta regulación ocurre en la mayoría de los casos por la modulación de la cantidad o de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa (288). Sin embargo, la existen

cia de puntos secundarios de control a nivel de otras - enzimas implicadas en la conversión de mevalonato a esteroles, ha sido demostrada (309). Tal es el caso de la - enzima pirofomevalonato descarboxilasa, que muestra - fluctuaciones en su actividad bajo determinadas condi- ciones experimentales (231,233).

Las dietas utilizadas en este trabajo, a fin de modificar el flujo de colesterol desde el lumen hacia la mucosa intestinal, han sido una dieta estandar suplementada con colesterol al 5% o colestiramina al 3%. La colestiramina es una resina de intercambio aniónico que actúa secuestrando ácidos biliares en el lumen intestinal, provocando como consecuencia una hipocolesterolemia y un incremento en la biosíntesis corporal de colesterol.

La alimentación con una dieta de colesterol al 5% durante 5 días provoca en todas las fracciones aisladas a lo largo del eje vellosidad-cripta, una inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa. Además, y sobre todo cuando se examinan los valores de actividad total, esta inhibición aparece en forma de gradiente desde la zona proximal hacia la zona distal, siendo máximo en íleon - (alrededor de un 50%) y mínimo en duodeno.

De forma semejante, la PPMVA descarboxilasa - también es inhibida por el colesterol de la dieta. La - inhibición se manifiesta en todas las fracciones del eje vellosidad-cripta, tanto en la zona distal, como en la región del duodeno y yeyuno.

Los niveles de colesterol total y libre también fueron determinados, con el fin de establecer algu

na posible correlación entre las variaciones en la velocidad de síntesis y esterificación, así como en el contenido en esteroides de la mucosa intestinal. El máximo incremento en el contenido en colesterol total, corresponde sobre todo a la zona del duodeno, seguida del yeyuno, en tanto que los niveles en íleon son solo ligeramente superiores a los controles. El aumento en colesterol total se debe sobre todo a una elevación en el colesterol esterificado, que si bien en controles representa un 5-10% del colesterol total, en pollos alimentados con colesterol, supone un 30% y un 20% en duodeno y yeyuno respectivamente.

La actividad ACAT aumenta enormemente en condiciones de una dieta con colesterol al 5%. Este aumento es mas patente en las fracciones correspondientes a las células superiores y medias de la vellosidad, zona que se corresponde con la de mayor actividad ACAT a lo largo del eje vellosidad-cripta.

El hecho de que la actividad ACAT intestinal - se encuentre activada tras la administración de una dieta rica en colesterol, constituye así mismo otra prueba a favor de la implicación de esta enzima en la absorción de colesterol luminal. Observaciones semejantes han sido realizadas en rata (184, 270), cobaya (270) y conejo - (304). En rata, este incremento tiene lugar predominantemente a nivel de yeyuno, lugar donde ocurre de forma mayoritaria la absorción intestinal de colesterol (279). En conejo este efecto parece ser mas uniforme y tiene - lugar a lo largo de todo el intestino.

En cuanto a la intensidad de la activación ob

servada en distintos animales, quizás dependa de las condiciones de ensayo y del tipo de dieta, así como del tiempo de administración. En conjunto, se puede establecer que el proceso de activación se debe a un efecto de disponibilidad de colesterol que sirve de sustrato a la enzima. Efectivamente, en el pollo existe una elevación en el contenido de colesterol intracelular, que afecta tanto a los "pools" de colesterol libre como esterificado y seguramente sirve de sustrato a la ACAT, que en condiciones basales no está saturada.

Resultados obtenidos mediante la utilización de cicloheximida (266) sugieren que una síntesis protéica activa no es condición necesaria para la activación de la ACAT por una dieta rica en colesterol y que por tanto la enzima preexistente tiene suficiente capacidad para esterificar el colesterol adicional. De cualquier forma, no se puede descartar la existencia de otros mecanismos de regulación tales como una fosforilación o defosforilación de la enzima.

También en esta serie de experimentos se ha determinado de forma rutinaria la actividad acil-CoA hidrolasa en todas las fracciones celulares obtenidas. La ausencia de diferencias significativas en todos los casos, permiten afirmar que la utilización del oleil-CoA por esta enzima, no interfiere en la determinación de la actividad ACAT.

En cuanto a los niveles de síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, solo destacar una ligera activa ción, considerada en términos de actividad específica, en la zona superior de las vellosidades de yeyuno. Este au-

mento, que también aparece al tener en cuenta los valores de la actividad total en duodeno, quizás sea resultado del aumento en la demanda de triglicéridos y fosfolípidos para su incorporación a VLDL, que tendría lugar en condiciones de una dieta rica en colesterol. Es interesante recordar la elevada capacidad del pollo para desarrollar una pronunciada hipercolesterolemia tras una alimentación prolongada con colesterol (310), situación que debe ser alcanzada por la existencia de un sistema activo que permita una eficaz absorción del colesterol luminal.

La administración de una dieta suplementada con colestiramina, aumenta enormemente la actividad HMG-CoA reductasa en todas las fracciones celulares aisladas a lo largo del eje vellosidades-criptas de duodeno, yeyuno e íleon. En cuanto a la PPMVA descarboxilasa, se observa una activación patente en el duodeno, siendo menor en las restantes zonas intestinales.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en relación con el efecto de una dieta suplementada con colestiramina, sobre la síntesis intestinal de esteroides (184).

Al examinar bajo estas mismas condiciones los niveles de colesterol en las distintas fracciones obtenidas, se observa que en ningún caso existe una diferencia significativa en el contenido, tanto en colesterol total como libre. Estos resultados, junto con los obtenidos en pollos tratados con una dieta suplementada con colesterol, demuestran claramente que la regulación de la síntesis de esteroides en el intestino no puede ser explicada simplemente en base a un aumento o disminución

de colesterol en el interior del enterocito.

Contrariamente a lo que se podría esperar, la actividad ACAT permanece prácticamente inalterada tras la administración de una dieta con colestiramina. Si algún efecto se puede destacar, es una ligera activación en las células superiores de la vellosidad de íleon. Estas observaciones coinciden con lo descrito en rata para la ACAT hepática (311) e intestinal (184), aunque en mucosa intestinal de conejo se ha descrito una inhibición de la ACAT por efecto de la colestiramina (268).

De cualquier forma, nuestros resultados, junto con los de otros autores, inducen a pensar que existen unos niveles basales de ACAT que no pueden ser modificados por debajo de unos límites, aunque se reduzca pronunciadamente la absorción intestinal de esteroides.

A estas observaciones se une el hecho de que el papel de la ACAT en la esterificación del colesterol sintetizado en el interior del enterocito está sujeto a controversia. Así, se ha demostrado en cultivos de mucosa intestinal, que aún en condiciones de una elevada síntesis endógena de esteroides, muy poco o prácticamente ningún colesterol, se encuentra en la forma esterificada (269). Parece ser, al contrario de la enzima hepática (312), que la ACAT intestinal, esterifica predominantemente el colesterol absorbido del lumen intestinal. En este sentido, un trabajo reciente realizado por Stange y Dietschy (313), señala que en ausencia de una activa absorción intestinal de grasas, los esteroides sintetizados en la mucosa intestinal son utilizados predominantemente con fines estructurales por el propio epitelio intestinal,

y no constituyen un sustrato para la síntesis de quilomicrones.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, junto con los de otros autores (184,269), parecen apoyar la existencia de una serie de "pools" de colesterol en el interior del enterocito. Estos "pools" son distintos desde un punto de vista funcional, y responden de manera distinta a las diferentes necesidades metabólicas del epitelio intestinal.

La organización intracelular del colesterol en la mucosa intestinal, respondería al esquema representado en el esquema 4 (pag. 64), sugerido inicialmente por Stange y Col (184), y que resulta compatible con los resultados obtenidos por nosotros.

El "pool" A, que se puede definir como el colesterol absorbido del lumen intestinal, serviría de sustrato mayoritario a la ACAT. Este hecho viene apoyado por el gran incremento observado en la actividad ACAT tras la administración de una dieta rica en colesterol. El aumento en la actividad sería consecuencia de una elevada disponibilidad de colesterol que sirve de sustrato a la enzima.

Una dieta suplementada con colestiramina activaría el proceso de síntesis y por tanto el flujo de colesterol a través del "pool" B; sin embargo, dado que no constituye sustrato de la ACAT, la actividad de esta enzima prácticamente no varía.

En la rata (184), los "pools" A y B serían tam

bién distintos desde un punto de vista funcional, ya que el colesterol de la dieta carece de efecto sobre la colesterogénesis. En el pollo sin embargo, quizás exista una mayor interconexión, considerando la inhibición observada en las enzima HMG-CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa. De todas maneras el grado de inhibición varía según la región considerada y en cualquier caso es considerablemente menos pronunciada que la observada en la reductasa y descarboxilasa hepática bajo las mismas condiciones (314).

Una disminución en la absorción del colesterol luminal por efecto de la colestiramina, pone de manifiesto a su vez la interconexión entre el "pool" A y el "pool" C de colesterol metabólicamente activo. Una disminución en la cantidad de colesterol necesario para síntesis de membranas, traería como consecuencia una activación de la colesterogénesis, reflejada en la elevación de la actividad HMG-CoA reductasa.

Es importante destacar que el modelo propuesto está basado en consideraciones generales sobre los resultados obtenidos, así como en numerosos datos obtenidos por otros autores. Es probable que la importancia relativa del colesterol absorbido, frente al de síntesis endógena, varíe según la región considerada y el tipo de dieta utilizado. En cualquier caso, es interesante comprobar que en el pollo, igual que en rata, parecen existir distintos "pools" intracelulares de colesterol, que regulan la velocidad de síntesis y esterificación, y que son fundamentalmente diferentes desde un punto de vista funcional.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- La determinación de los niveles de actividad fosfatasa alcalina (enzima marcadora de las células superiores de la vellosidad), timidina kinasa (enzima marcadora de las células de las criptas) y fosfatasa ácida (enzima indicadora de la viabilidad celular), nos ha permitido la caracterización de enterocitos aislados de duodeno, yeyuno e íleon en pollos de 4-5 semanas, mediante técnicas bioquímicas basadas en la utilización de diferentes tampones. La observación microscópica de las preparaciones obtenidas a distintos tiempos pone de manifiesto la idoneidad del método de aislamiento.
- 2.- Se han determinado el contenido en colesterol total y libre, así como las actividades enzimáticas HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa y ACAT en enterocitos aislados de duodeno, yeyuno e íleon, habiéndose establecido las condiciones óptimas para su estudio "in vitro".
- 3.- En condiciones normales, el colesterol libre representa en torno al 95% del colesterol total en todas las fracciones celulares estudiadas, siendo el íleon el que exhibe mayor contenido en colesterol total (1.5-2 veces superior al de duodeno y yeyuno).
- 4.- El yeyuno es, de entre las regiones estudiadas,

la que presenta la máxima actividad HMG-CoA reductasa (3-4 veces superior a la de duodeno y alrededor de 1.5 veces a la de íleon), y la máxima actividad ACAT (2 veces superior a la de íleon). En cambio, la actividad PPMVA descarboxilasa es similar a lo largo de las tres regiones estudiadas. En relación al eje vellosidades criptas, la actividad ACAT es máxima en las células superiores y medias del yeyuno, no existiendo diferencias significativas en duodeno e íleon. La PPMVA descarboxilasa presenta un claro gradiente de actividad, siendo mínima en las células superiores y máxima en las criptas de las tres regiones estudiadas. La actividad HMG-CoA reductasa no presenta diferencias significativas a lo largo del eje en ninguna de las regiones.

- 5.- Una distribución semejante entre duodeno, yeyuno e íleon de las actividades HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa y ACAT se obtiene cuando los ensayos se realizan en mucosa raspada, si bien las actividades HMG-CoA reductasa y ACAT observadas son 6-7 veces inferiores a las obtenidas en células aisladas. En cambio, la actividad PPMVA descarboxilasa es similar tanto en células aisladas como en mucosa raspada.
- 6.- El yeyuno es la región que presenta la máxima incorporación de oleil-CoA tanto a triglicéridos como a fosfolípidos, siendo la incorporación a triglicéridos alrededor de 3-4 veces superior a la observada en duodeno, y de 5-6 ve-

ces superior a la de íleon. La incorporación a fosfolípidos es 2-3 veces superior a la observada en duodeno e íleon.

- 7.- La suplementación de la dieta con colesterol al 5% produce un incremento en torno al 200% del contenido en colesterol total, tanto en duodeno como en yeyuno, no afectando prácticamente al contenido en íleon. En cambio, el porcentaje en colesterol libre desciende hasta alrededor del 70% en duodeno, el 80% en yeyuno y el 90% en íleon. Así mismo, tanto la actividad HMG-CoA reductasa, como la PPMVA descarboxilasa, disminuyen fuertemente (40-50%) en todas las fracciones celulares aisladas de duodeno, yeyuno e íleon, mientras que la ACAT incrementa su actividad de 3-5 veces en todas las fracciones celulares de las distintas regiones estudiadas, siendo este incremento más acusado en las células superiores y medias de la vellosidad, que en las células inferiores o en las de las criptas.

- 8.- La suplementación de la dieta con colestiramina al 3% no varía sustancialmente el contenido en colesterol total ni libre a lo largo de las distintas fracciones celulares aisladas de duodeno, yeyuno e íleon. La HMG-CoA reductasa incrementa su actividad alrededor de 3 veces en duodeno, y de 2 veces en yeyuno e íleon. En cambio, aunque en duodeno la actividad PPMVA descarboxilasa aumenta significativamente (1.5-2 veces), tanto

en yeyuno como en íleon dicha actividad aumenta solo ligeramente o bien no se modifica. De la misma manera, la actividad ACAT permanece prácticamente inalterada tras la administración de una dieta con colestiramina.

Conclusión Final

Los resultados obtenidos en el presente trabajo inducen a pensar que la importancia relativa del colesterol absorbido, frente al de síntesis endógena, varía según la región estudiada, el tipo celular considerado y la dieta utilizada. Así mismo, nuestros resultados apoyan la existencia en enterocitos de distintos "pools" funcionales de colesterol, los cuales responden de diferente manera frente a las diferentes situaciones metabólicas del intestino.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BLOCH, K., BOREK, E. and RITTENBERG, D. (1946) J. Biol. Chem. 162:441-449.
- 2.- BLOCH, K. (1965) Science 150:19-28.
- 3.- SKEGGS, H.R., WRIGHT, L.D., Cresson, E.L., MAC RAE, G. D.E., HOFFMAN, C.H., WOLF, D.E. and FOLKERS, K. (1956) J. Bacteriol. 72:519-524.
- 4.- CLINKEENBEARD, K.D., REED, W.D., MONEY, R.A. and LANE, M.D. (1975) J. Biol. Chem. 250:3108-3116.
- 5.- WEINSTOCK, S.B., KOPITO, R.R., ENDEMAN, G., TOMERA, J. F., MARINIER, E., MURRAY, D.M. and BRUNENGRABER, H. -- (1984) J. Biol. Chem. 259: 8939-8944.
- 6.- EDMOND, J. and POPJAK, G. (1974) J. Biol. Chem. 249: 66-71
- 7.- AGUILERA, J.A., LINARES, A., ARCE, V. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1982) Com. Biochem. Physiol. 71 B: 617-621.
- 8.- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L. and MITSCHELEN, J.J. - (1976). Adv. Lipid Res. 14: 373-412.
- 9.- BEITIA, E.D. and PORTOR, J.W. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45: 113-142.
- 10.- GOUGH, D.P. and HEMMING, F.W. (1970) Biochem. J. 118: 163-166.
- 11.- POPJAK, G., GOODMAN, W.S., CORNFORTH, J.W., CORNFORTH, R.H. and RYHAGE, R. (1961) J. Biol. Chem. 236: 1934 - 1947.
- 12.- OLSON, R.E. (1968) In: Vitamins and hormones. Harris, R. S., Wool, I.G. and Lorraine, J.A. (ed.) Academic Press. New York 24: 551-574.

- 13.- HALL, R.H. (1970). In progress in nucleic acid research and Molecular Biology. J.N. Davidson and W.E. Cohn (ed.) Academic Press. New York 10: 57-86.
- 14.- FAUST, J.R. , GOLDSTEIN, J.L. and BRAUN, M.S. (1979) -- Arch. Biochem. Biophys. 192: 86-89.
- 15.- MILLS, J.T. and ADAMANY, A.M. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5270-5273.
- 16.- BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (1980) J. Lipid Res. 21: 505-517.
- 17.- WISS, O. and WISS, V. (1977) Helvetica Chim. Acta 60: 2686-2694.
- 18.- SLAKEY, L.L., CRAIG, M.C., BEYTIA, E. et al. (1972) J. Biol. Chem. 247: 3014-3022.
- 19.- TURLEY, S.D. and DIETSCHY J.M. (1982) In: Arias, I., - Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. (eds.). The liver: Biology and pathobiology. Raven Press, New York pp.: 467-492.
- 20.- MATHE, D. and CHEVALLIER, F. (1980) Digestion 20: 121-126.
- 21.- CHEVALLIER, F. (1963) Ann. Nutr. Aliment. 17: 51-57.
- 22.- TREADWELL, C.R. and Vahouny, G.V. (1968) Cholesterol - absorption. Handbook of physiology. Vol. 3 pp. 1407-1438 (Am. Physiol. Soc., Washington).
- 23.- LUTTON, C. and CHEVALLIER, F. (1972) Biochim. biophys. Acta 260: 133-137.
- 24.- CHEVALLIER, F. and LUTTON, C. (1972) Biochim. biophys. Acta 274: 382-386.
- 25.- STRAUSS, E.W. (1966) J. Lipid Res. 7: 307-323.

- 26.- GLOVER, J. and MORTON, R.A. (1958) Br. Med. Bull. 14: 226-233.
- 27.- BORGSTROM, B. (1974) Fat digestion and absorption.-- Biomembranes, Vol. 4B, Smith, D.H. (ed.) New York -- Plenum Press, pp. 555-620.
- 28.- HATCH, F.T., ASO, Y., HAGOPIAN, C.M. and RUBINSTEIN, J.L. (1966) J. Biol. Chem. 241: 1655-1662.
- 29.- WINDMUELLER, H.G. and SPAETH, A.E. (1972) J. Lipid - Res. 13: 92-97.
- 30.- HAVEL, R.J. , GOLDSTEIN, J.L. , BROWN, M.S. (1980) in Metabolic Control and Disease, P.K. Bondy and L.E. Rosenberg Eds. (Sanders, Philadelphia ed. 8) p. 393.
- 31.- STEIN, O., STEIN, Y., GOODMAN , D.S. and FIDGE, N. (1969) J. Cell Biol. 43: 410-417.
- 32.- SIPERSTEIN, M.D. (1970) Curr. Top. cell. Regul. 2: 65-72.
- 33.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, H.D. (1970) N. Engl. J. Med. 282: 1128-1133.
- 34.- PATTNAIAK, N.M., MONTES, A., HUGHES, L.B. and ZILVERSMIT, D.B. (1978) Biochim. biophys. Acta 530: 428-433.
- 35.- LANGER, T., STROBER, W. and LEVY, R.T. (1972) J.Clin. Invest. 51: 1528-1537.
- 36.- BROWN, M.S., KOVANEN, P.T. and GOLDSTEIN, J.L. (1981) Science 212: 628-635.
- 37.- HENRIKSEN, T., MAHONEY, E.M. and STEINBERG, D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6499-6503.
- 38.- BASU, S.K. GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3852-3861.
- 39.- MAHLEY, R.W. and INNERARITY, T.L. (1983) Biochim. Biophys. Acta 737: 197-222.

- 40.- SZERE, P.A. CHAIKOFF, I.L. TREITMAM, S.S. et al (1950) J. Biol. Chem. 182: 629-634.
- 41.- POPJAK, G. BEECKMANS, M.L. (1950) Biochem. J. 47: 237-238.
- 42.- GOULD, R.G. COOK, R.P. (1958) The metabolism of cholesterol and other sterols in animal organisms. In "Cholesterol", ed. by Cook, R.P., Academic Press, New York 237-307.
- 43.- KRITCHEVSKY, D. (1958) Cholesterol, John Wiley Sons, New York.
- 44.- AGUILERA, J.A. (1984) Tesis doctoral. Univ. Granada.
- 45.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. (1979) J. Lipid Res. 20: 740-752.
- 46.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, J.D. (1968) J. Clin. Invest. 47: 166-174.
- 47.- DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1967) J. Lipid Res. 8: 97-104.
- 48.- MARCO, C., RAMIREZ, H., GONZALEZ-PACANOWSCA, D. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1985) Neurochem. Int. 7:131-135.
- 49.- FIELD; F.J. (1984) J. Lipid res. 25: 389-399.
- 50.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. (1979) J. Lipid Res. 20: 740-752.
- 51.- JESKE; P.J. and DIETSCHY, J.M. (1980) J. Lipid Res. - 21: 364-369.
- 52.- TURLEY, S.D., ANDERSEN, J.M. and DIESTCHY, J.M. (1981) J. Lipid Res. 22: 551-569
- 53.- DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1965) J. Clin - Invest. 8 : 1311-1327
- 54.- HELGERUD, P., HAUGEN, R. and NORUM, K.R. (1982) Eur. - J. Clin. Invest. 12: 493-500.

- 55.- TAYLOR, C.B. and GOULD R.G. (1950) *Circulation* 2: 467-474.
- 56.- GOULD, R.G. (1951) *Amer. J. Med.* 11: 209-217
- 57.- TOMKINS, G.M., SHEPPARD, H and CHAIKOFF, I.L. (1953) *J. Biol. Chem.* 201: 137-145
- 58.- SIPERSTEIN, M.D. and FAGAN, V.M. (1964) *Adv. Enz . Reg.* 2: 249-256
- 59.- BUCHER, N.L.R., RVERATH, P. and LYNEN, F. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* 40: 491-499
- 60.- GRUNDY, S.M. , HOFMAN, A.F., DAVIGNON, J. and AHRENS, E. J. (1966) *J. Clin. Invest.* 45: 1018-1027
- 61.- WILSON, J.D. (1972) *Arch. Intern. Med.* 130: 493-501
- 62.- CHEVALLIER, F. (1966) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48: 715-728.
- 63.- BASU, S.K. GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 3852-3861.
- 64.- PURDY, B.H. and FIELD, F.J. (1984) *J. Clin. Invest.* 74: 351-357.
- 65.- GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1977) *Metabolism* 26: 1257-1265.
- 66.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY J.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 9024-9033.
- 67.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY J.M. (1977) *J. Biol. -- Chem.* 252: 3652-3662.
- 68.- BALAMBRAMANIAM, S., GOLDSTEIN, J.L. , FAUST, J.R., - BRUNSCHEDE, G.Y. and BROWN, M.S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 1771-1779.
- 69.- TOMKINS, G.M. and CHAIKOFF, I.L. (1952) *J. Biol. Chem.* 196: 569-573.
- 70.- RAMIREZ, H. ALEJANDRE, M.J. and GARCIA-PEREGRIN, E. - (1982) *Lipids* 17: 434-436.

- 71.- MAYER, D. (1976) Arch. Toxicol. 36: 267-276.
- 72.- BHATTACHARYYA, A.K., CONNOR, W.E. and SPECTOR, A.A. (1972) J. Clin. Invest. 51: 2060-2067.
- 73.- MIETTINEN, T.A. (1970) Ann. Clin. Res. 2: 300-307.
- 74.- LACK, L. and WEINER, I.M. (1961) Amer. J. Physiol. 200: 313-321.
- 75.- DIETSCHY, J.M., SALOMON, H.S. and SIPERSTEIN, M.D. (1964) J. Clin. Invest. 45: 832-837.
- 76.- MIETTINEN, T.A. (1975) in: Hypolipidemic agents (Ed. D. Kritchevsky) p. 109 Berlin, Springer-Verlag
- 77.- ERIKSSON, S. (1957) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94:578-586.
- 78.- TENNENT, D.M., SIEGEL, H. and ZANETTI, M.E. (1960) J. Lipid Res. 1: 469-476.
- 79.- MATHE, D. and CHEVALLIER, F. (1980) Digestion 20: 121-129.
- 80.- THOMSON, A.B.R. & DIETSCHY, J.M. (1981). in Physiology of the gastrointestinal tract. L.R. Johnson (ed.) Raven New York, pp. 1147-1220.
- 81.- TURLEY, S.D., ANDERSEN, J.M. & DIETSCHY, J.M. (1981). J. Lipid Res. 22: 551-559.
- 82.- IMONDI, A.R. and BIRD, F.H. (1966) Poult. Sci. 38: 545-550.
- 83.- ADMIRAND, W.H. and SMALL D.M. (1968) J. Clin. Invest. 47: 1043-1049.
- 84.- DOWLING, R.H., MACK, E. and SMALL D.M. (1971) J. Clin. Invest. 50: 1917-1922.
- 85.- COINE, M.J., BONORRIS, G.G., CHUNG, A., COVE, H and SCHOEN FIEL, L.J. (1977) Gastroenterology 72: 927-937.

- 86.- DEN BESTEN, L. CONNOR, W.E. and BELL, S. (1973)
Surgery 73: 266-273.
- 87.- OSUGA, T., PORTMAN, O.W., TANAKA, N., ALEXANDER, M.
and OCHSNER, A.J. (1976) J. Lab. Clin. Med. 88: 649-
658.
- 88.- NORUM, K.R., HELGERUD, P. PETERSON, L.B., GROOT, P.H.
E. and DE JONGE, H.R. (1983) Biochim. Biophys. Acta
751: 153-161.
- 89.- ROSENFELD, R.S., FUKUSHINA, D.K., HELLMAN, L. and -
GALLAGHER, T.F. (1954) J. Biol. Chem. 211: 301-309.
- 90.- SPADY, D.K. and DIETSCHY, J.M. (1983) J. Lipid Res.
24: 303-315.
- 91.- THOMSON, A.B.R. and DIETSCHY, J.M. (1981) In Physio-
logy of the gastrointestinal Tract. L.R. Johnson (ed)
Raven Press, New York 1147-1220.
- 92.- ANDERSEN, J.M., TURLEY, S.D. and DIETSCHY, J.M. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 711: 421-430.
- 93.- SWAN, A., NILEY, M.H. and SIPERSTEIN, M.D. (1975) J.-
Lipid res. 16: 360-366.
- 94.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) Lipids 11: 511-517.
- 95.- DIETSCHY, J.M. and GAMEL, W.G. (1971) J. Clin. Invest.
50: 872-880.
- 96.- TURLEY, S.D. and DIETSCHY, J.M. (1982) In: The liver:
Biology and Pathobiology. Arias, I., POPPER, H., -
SCHACHTER, D. and SHAFRITZ, D.A. (ed.) Raven Press.
New York 467-492.
- 97.- HILL, K.J. (1971) In: Physiology and Biochemistry of
the Domestic Fowl. Bell, D.J., Freeman, B.M.(ed.) --
Vol 1, pp. 1-22. London, New York.

- 98.- JOHNSTON, J.M. (1977). In Lipid Metabolism in Mammals Vol. 1, Fred SNYDER (ed.) Plenum Press, New York. -- pp. 151-187.
- 99.- ERLANSON, C. FERNLUND, P, and BORGSTROM, B. (1973) - Biochim. Biophys. Acta 310: 437-445.
- 100.- BORGSTROM, .B. (1974) Fat digestion and absorption - Biomembranes, Vol. 4B, Smyth, D.H. (ed.) New York: Plenum Press, pp. 555-620.
- 101.- FRIEDMAN, H.I. and NYLUND, B. (1980) Am. J. of Clin. Nutr., 33: 1108-1139.
- 102.- BRINDLEY, D.N. (1984) In: Fats in animal nutrition, Wiseman, J. (ed.) London: Butterworths, pp. 85-103.
- 103.- BRINDLEY, D.N. (1974). In Biomembranes, Vol. 4B, - Smyth, D.H. (ed.) New York : Plenum Press, pp. 621-671.
- 104.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, J.D. (1968) J. Clin. - Invest. 47: 166-174.
- 105.- SWELL, L. TROUT, E.C. HOPPER, J.R. FIELD and TREADWELL, C.R. (1958) Biochim. Biophys. Acta 98: 607-616.
- 106.- VAHOUNY, G.V., WEERSING, S. and TREADWELL, C.R. (1965) Biochim. Biophys. Acta 98: 607-616.
- 107.- SUZUKI, R. (1968) Keio J. Med. 17: 169-187.
- 108.- ASHWORTH ; C.T. and JOHNSTON, J.M. (1963) J. Lipid res. 4: 454-460.
- 109.- STRAUSS, E.W. (1966) J. Lipid res. 7: 307-323.
- 110.- DERMER, G.B. (1968) J. Ultrastruct. res. 22: 312-325.
- 111.- WESTERGAARD, H. and DIETSCHY, J.M. (1976) J. Clin. - Invest. 58: 97-108.
- 112.- DIETSCHY, J.M., SALLEE, V.L. and WILSON, F.A. (1971) Gastroenterology 61: 932-934.

- 113.- GALLU, L.L., CLARK, S.B., MYERS, S, and VAHOUNEY, G. V. (1983) Fed. Proc., 42: 1256.
- 114.- SUCKLING, K.E., STANGE, E.F. and DIETSCHY, J.M. (1983) FEBS Lett., 151: 111-116.
- 115.- DIETSCHY, J.M. (1969) gastroenterology 57: 461-464.
- 116.- PURDY, B.H. and FIELD, F.J. (1984) J. Clin. Invest. 74: 351-357.
- 117.- JEAN, D.W. and ROBERT, T.R. (1968) J. Lipid Res. 18: 722-731.
- 118.- BENSADOUM, A. and ROTHFELD, A. (1972) Proc. Soc. Exp. Biol. med. 41: 814-817.
- 119.- ZILVERSMIT, D.B. (1978). In Disturbances of lipid and lipoprotein metabolism, Dietschy, J.M., Gotto, A. and Ontko, J.A. (eds.). Bethesda: American Physiological Society, pp. 69-81.
- 120.- HIGGINS, J.A. and BARNETT, R.J. (1971) J. Cell. Biol. 50: 102-120.
- 121.- FRIEDMAN, H.I. and NYLUND, B. (1980) Am. J. of Clin. Nutr. 33: 1108-1139.
- 122.- HYAMS, D.E. SABESIN, S.M. GREENBERGER, N.J. and ISSELBACHER (1966) Biochim. Biophys. Acta 125: 166-173.
- 123.- KARVINEN, E. and MIETTINEN, M. (1966) Acta Physiol. - Scand. 68: 228-230.
- 124.- GLICKMAN; R.M. and KIRSCH, K. (1973) J. Clin. Invest. 52: 2910-2920.
- 125.- BRINDLEY, D.N. and HUBSCHER. (1966) Biochim. Biophys. Acta 125: 92-105.
- 126.- BICKERSTAFFE, B. and ANNISON, E.F. (1969) Biochem. J. 111: 419-429.

- 127.- BRINDLEY, D.N. (1974) *Biomembranes* 4B: 621-671.
- 128.- JOHNSTON, J.M., RAO, G.A. and LOWE, P.A. (1967) -
Biochim. Biophys. Acta 137: 578-580.
- 129.- JOHNSTON, J.M., PALTAUF, F., SCHILLER, C.M. and -
SCHULTZ, L.D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 218: 124-
133.
- 130.- COLEMAN, R. and HUBSCHER, G. (1962) *Biochim. Biophys.*
Acta 56: 479-490.
- 131.- BRINDLEY, D.N. and HUBSCHER, G. (1965) *Biochim. Bio-*
phys. Acta 106: 495-509.
- 132.- RAO, G.A., SORRELS, M.F. and REISER, R. (1970) *Lipids*
5: 762-764.
- 133.- CLARK, B. and HUBSCHER, G. (1961) *Biochim. Biophys.*
Acta 46: 479-494.
- 134.- BROWN, J.L. and JOHNSTON, J.M. (1964) *Biochim. Bio-*
phys. Acta 84: 264-274.
- 135.- BROWN, J.L. and JOHNSTON, J.M. (1964) *Biochim. Bio-*
phys. Acta 84: 448-457.
- 136.- AILHAND, G. SAMUEL, D. LAZDUNSKI, M. and DESNUELLE,
P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 84: 643-644.
- 137.- MANSBACH, C.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 296:
386-400.
- 138.- NEGREL, R. and AILHAND, G. (1975) *FEBS Lett.* 54: 183-
188.
- 139.- TANDON, R., EDWARDS, R.H. and ROGERS, J.B. (1972)
Gastroenterology 63: 990-1003.
- 140.- POWELL, G. K. and Mc ELVEEN, M.A. (1974) *Biochim. Bio-*
phys. Acta 369: 8-15.
- 141.- RODGER, J.B. and BOCHENEK, W. (1970) *Biochim. Biophys.*
Acta 202: 426-435.

- 142.- GELB, A.M., DAVIDSON, M.I. and KESSLER, J.I. (1964) Am. J. Physiol. 207: 1207-1210.
- 143.- Mc MANUS, J.P.A. and ISSELBACHER, K.J. (1970) Gastroenterology 59: 214-221.
- 144.- ISSELBACHER, K.J. (1965) Fed. Proc. 24: 16-22.
- 145.- RODGERS, J.B., RILEY, E.M., DRUMMEY, G.D. and ISSELBACHER, K.J. (1967) Gastroenterology 53: 547-556.
- 146.- JOHNSTON, J.M. (1976) In: K. Rommail (ed.) Biochemical and clinical Aspects of Lipids Absorption. pp. 38-42. Titisee, F.K. Schattner Verlag. Stuttgart, New York.
- 147.- PALTAUF, F. and JOHNSTON, J.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 239: 47-56.
- 148.- GEBHARD, R.L. and PRIGGE, W.F. (1981) J. Lipid Res. 22: 1111-1118.
- 149.- STANGE, E.F., PRECLIK, G., SCHNEIDER, A., SEIFFER, E. and DITSCHUNEIT; H. (1981) Biochim. Biophys. Acta 678: 202-206.
- 150.- STANGE, E.F. and DIETSCHY, J.M. (1983) J. Lipid Res. 24: 72-82.
- 151.- MERCHANT, J.L. and HELLER, R.A. (1977) J. Lipid Res. 18: 722-733.
- 152.- MUROYA, H. SODHI, H.S. and GOULD, R.G. (1977) J. Lipid Res. 18: 301-308.
- 153.- RAO, A.V. and RAMAKRISHAN, S. (1982) Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 19: 195-200.
- 154.- HUANG, W.Y. and KUMMEROW, F.A. (1976) Lipids 11: 34-41.
- 155.- THOMPSON, J.R., BEITZ, D.C. and JACOBSON, N.L. (1977) J. Nutr. 107: 1632-1639.

- 156.- LIEPA, G.V., BEITZ, D.C. and LINDER, J.R. (1978) J. Nutr. 108: 535-543.
- 157.- TAYLOR, C.B., COX, G.E. and NELSON, L.G. (1955) Circulation 12: 489-497.
- 158.- KRUNDIECK, C.L. and HO, K. (1977) and J. Clin. Nutr. 30: 255-261.
- 159.- ANGEL, A. and BRAY, G.A. (1979) Eur. J. Clin. Invest. 19: 355-362.
- 160.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, J.D. (1968) J. Clin. --- Invest. 47: 166-174.
- 161.- DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1965) J. Clin. Invest. 44: 1311-1327.
- 162.- TABACIK, C., ALIAN, S., ASTRUC, M. and CRASTES de - PAULET, A. (1981) Biochim. Biophys. Acta 666: 433-441.
- 163.- TURLEY, S.D. and WEST, L.E. (1976) Lipids 11: 571-577.
- 164.- GEBHARD, R.L. and COOPER, A.D. (1978) J. Biol. Chem. 253: 2790-2796.
- 165.- BOCHENEK, W.J. and RODGERS, J.B. (1979) Biochim. Biophys. Acta 575: 57-62.
- 166.- RAMIREZ, H. (1980) Tesis doctoral. Univ. Granada.
- 167.- WILSON, J.D. (1962) Am. J. Physiol. 203: 1029-1032.
- 168.- SCHNEIDER, A., STANGE, E.F., ALAVI, M. DITSCHUNEIT, H. and POLEY, J.R. (1979) J. Lipid Res. 20: 1048-1056.
- 169.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) Lipids 11: 571-577.
- 170.- GALLO, D.G. HURKINS, R.W., SCHEFFNER, A.L., SARETT, H.P. and COX, W.M. (1966) Ibid 122: 328-334.
- 171.- DAUHOF, I.E. (1966) Am. J. Clin. Nutr. 18: 343-351.
- 172.- DIETSCHY, J.M. (1968) Ibid 47: 286-291.
- 173.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) Lipids 11: 571-577.

- 174.- ROGERS, D.H., KIM, D.N., LEE, K.T., REINER, J.M. and THOMAS, W.A. (1981) *J. Lipid Res.* 22: 811-819.
- 175.- CASSIDY, M.M., LIGHTFOOT, F., GRAU, L. KRITCHEVSKY, D. and VAHOUNY, G. (1980) *Fed. Proc.* 2368-2376
- 176.- SCHWARTZ, S.E., STARR, C. BACHMAN, S. and HOLTZAPPLE, P.G. (1983) *J. Lipid Res.* 24: 746-752.
- 177.- STRANDBERG, T.E., KUNSI, T., TILVIS, R.S. and MIETTINEN, T.A. (1983) *Pharmacology* 26: 290-296.
- 178.- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., Mac RAE, G. MOSER, A.H. - LEAR, S.R. and SIPERSTEIN, M.D. (1982) *Diabetes* 31: 388-395.
- 179.- FEINGOLD, K.R., ZSIGMOND, G. HUGHES-FULFORD, M. LEAR, S.R., and MOSER A.H. (1985) *Metabolism* 34: 1105-1109.
- 180.- GOODMAN, M.W., PRIGGE, W.F. and GEBHARD, R.L. (1981) *Am. J. Physiol.* 240: G274-G280.
- 181.- SPADY, D.K., BILHEIMER, D.W. and DIETSCHY, J.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3499-3503.
- 182.- KAGAMI, A. FIDGE, N. SUZUKI, N. NESTEL, P. (1984) --- *Biochim. Biophys. Acta* 705: 179-190.
- 183.- STANGE, E.F. and DIETSCHY, J.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5739-5743.
- 184.- STANGE, E.F., SUCKLING, K.E. and DIETSCHY, J.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 12868-12875.
- 185.- DIETSCHY, J.M. and BROWN, M.S. (1974) *J. Lipid Res.* -- 15: 508-517.
- 186.- SHAPIRO, D.J. and RODWELL, V.E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3210-3217
- 187.- CHIN, D.J., GIL, G. RUSSELL, D.W. LISCUM, L. LUSKEY, K.L. BASU, S.K. OKAGAMA, H., BERG, P., GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1984) *Nature* 308: 613-617.

- 188.- LISCUM, L. FINER-MOORE, J. STROND, R.M., LUSKEY, K.L., BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 522-530.
- 189.- SHEFER, S. HAUSER, S. LAPAR, V. and MOSBACH, E.H. -- (1972) *J. Lipid Res.* 13: 371-376.
- 190.- HELLER, R.A. and SHREWSBURY, M.A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 3815-3821.
- 191.- SUGANO, M., OKAMATSU, H. and IDE, T. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42: 2009-2014.
- 192.- PANINI. S.R. LEHRER, G., ROGERS, D.H. and RUDNEY, H. - (1979) *J. Lipid Res.* 20: 879-889.
- 193.- SUGANO. M., IDE, T. OKAMATSU, H., FUJISAKI, Y, and -- TAKAHARA, H. (1980) *Journal of Nutrition* 110: 360-370.
- 194.- BOCHENEK, W.J. and RODGERS, J.B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 575: 57-62.
- 195.- MITROPOULOS, A. VENKATESAN, S., BALASUBRAMANIAM, S. - and PETERS; T.J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82: 419-425.
- 196.- FIELD, F.J. ERICKSON, S.K., SCHREWSBURY, M.A. and -- COOPER, A.D. (1982) *J. Lipid Res.* 23: 105-113.
- 197.- SHEFER, S., HAUSER, S., LAPAR, V. and MOSBACH, E.H. - (1972) *J. Lipid Res.* 13: 402-412.
- 198.- FIELD, F.J. and SALOME, R.G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 712: 557-570.
- 199.- SHAPIRO, D.J. IMBLUM, R.L. and RODWELL, V.W. (1969) *Anal. Biochem.* 31: 383-385.
- 200.- HIGGINS, M. KAWACHI, T. and RUDNEY, H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 138-143.
- 201.- DUGAN, R.E., SLAKEY, L.L. BRIEDIS, A.V. and PORTER, J.W. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 21-27.

- 202.- HELLER, F.R. (1983) *Lipids* 18: 18-24.
- 203.- BEG, Z.H., ALLMANN, D.W. and GIBSON, D.M. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 1362-1371.
- 204.- NORDSTROM, J.L., RODWELL, V.W. and MITSCHELEN, J.J.
(1977) *J. Biol. Chem.* 252: 8924-8929.
- 205.- FIELD, F.J. ERICKSON, S.K. and COOPER, A.D. (1979)
Gastroenterology 77: A12.
- 206.- OKU, H., IDE, T. and SUGANO, M. (1984) *J. Lipid Res.*
25: 254-261.
- 207.- HIGGINS, M. and RUDNEY, H. (1973) *Nature. New. Biol.*
246: 60-65.
- 208.- GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1977) *Annu. Rev.*
Biochem. 46: 897-930.
- 209.- KANDUSTCH, A.A. CHEN, H.W. and HEINIGER, H.J. (1978)
Sciencie 201: 498-501.
- 210.- PANINI, S.R. SEXTON, R.C. and RUDNEY, H. (1984) *J.*
Biol. Chem. 259: 7767-7771.
- 211.- TANAKA, R.D. EDWARDS, P.A., LANG, S.F., FOGELMAM,
A.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 13331-13339.
- 212.- JENKE, H.S., LOWEL, M. and BRENDT, J. (1981) *J. Biol.*
Chem. 256: 9622-9625.
- 213.- VICKERS, J.D. and RATHBONE, M.P. (1979) *Enzymes* 57:
1144-1149.
- 214.- NAITO, M. (1978) *Cell. Structure and Function* 3: 227-
235.
- 215.- LANG, M. (1976) *Biochim, Biophys. Acta* 455: 947-956.
- 216.- BROWN, M.S., DANA, S.E. and GOLDSTEIN, J.L. (1974)
J. Biol. Chem. 249: 789-799.
- 217.- BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (1975) *Cell.* 6: 307-
312.

- 218.- STANGE, E.F. ALAVI, M., SCHNEIDER, A. PRECLIK , G. and DITSCHUNEIT, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 620: 520-527.
- 219.- SHEFER, S., HAUSER, S., LAPAR, V. and MOSBACH, E. H. (1973) *J. Lipid Res.* 14: 400-405.
- 220.- BORTZ, W.M. and STEELE, L.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 306: 85-92.
- 221.- KANDUTSCH, A.A. and CHEN, H.W. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 8408-8414.
- 222.- HAMPRECHT, B. NUSSLER, C., WALTINGER, G. and LYNEN, F. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18: 10-14.
- 223.- SCHNEIDER, A., STANGE, E.F., ALAVI, M. and DITSCHUNEIT, M. (1979) *J. Lipid Res.* 20: 1048-1049.
- 224.- GOLDFARB, S. and PITOT, H. (1972) *J. Lipid Res.* 13: - 797-801.
- 225.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) *Lipids* 11: 571-577.
- 226.- TANAKA, R.D. EDWARDS, P.A. LAN, S.F., KNOPEL, E.M. and FOGELMAN, A.M. (1982) *J. Lipid res.* 23: 1026-1031.
- 227.- OKU, H. and SUGANO, M. (1985) *Journal of Nutrition* - 115: 880-889.
- 228.- YOUNG, N.L., SAUDEK, C.D. and CRAWFORD, S.A. (1982)
- 229.- RAMACHANDRAN, C.K. and SHAH, S.N. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 42-51.
- 230.- ALVEAR, M., JABALQUINTO, A.M., EYZAGUIRRE, S. and -- CARDEMIL, E. (1982) *Biochemistry* 21: 4646-4655.
- 231.- JABALQUINTO, A.M. and CARDEMIL, E. (1980) *Lipids* 15: 196-209.
- 232.- GONZALEZ-PACANOSWKA, D., AGUILERA, J.A., ARCE, V. - GARCIA-MARTINEZ, J. LINARES, A and GARCIA-PEREGRIN, E. (1985) *Int. J. Biochem.* 17: 275-278.

- 233.- GONZALEZ-PACANOSWKA, D., MARCO, C., GARCIA-MARTINEZ, J. and GARCIA-PEREGRIN (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 833: 449-455.
- 234.- DURR, I.F. (1968) *Comp. Biochem. Physiol.* 25: 663-671.
- 235.- GONZALEZ-PACANOWSCA, D., MARCO, C., GARCIA-MARTINEZ and GARCIA-PEREGRIN, E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 875: 605-609.
- 236.- MARCO, C., GONZALEZ-PACANOWSCA, D., LINARES, A. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1983) *Neurochemical Research* 8: 711-719.
- 237.- BHAT, S.C. and RAMASARMA, T. (1979) *Biochem. J.* 181: 143-156.
- 238.- JABALQUINTO, A.M. and CARDEMIL, E. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 132-141.
- 239.- GONZALEZ-PACANOSWCA, D. MARCO, C, GARCIA-MARTINEZ, J., LINARES, A. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1985) *Nutrition Reports International* 31: 121-127.
- 240.- WEISER, M.M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 2536-2541.
- 241.- LOWRY, O.H , ROSEBROUGH, N,J., FARR. A.L. and RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 242.- KLEMPERER, H.G. and HAYNES, G.R. (1968) *Biochem. J.* 108: 541-546.
- 243.- BINGHAM, E.W. and ZITTLE, C.A. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 101: 471-477.
- 244.- SLAKEY, L.L., CRAIG, M.G., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESHI, A.A., SUBBARAYAN. C. and PORTER, J.W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 3014-3021
- 245.- SHAPIRO, D.J., NORDSTROM, K.L., MITSCHELIEN, J.J., RODWELL, V.W. and SHIMKE, R.T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370: 369-377.

- 246.- ALEJANDRE, M.J., RAMIREZ, H., SUÁREZ, M.D. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1981) *Biol. Neonate* 40: 232-236.
- 247.- BREITMAN, T.R. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67: 153-155.
- 248.- GOODMAN, D.S., DEYKIN, D. and SHIRATORI, T. (1964) - *J. Biol. Chem.* 239: 1335-1343.
- 249.- MARCO, C., MORILLAS, L.G. and GARCIA-PEREGRIN, E. - *Biochim. Biophys. Acta* En prensa.
- 250.- FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H. (1957) - *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- 251.- GONZALEZ-PACANOSWKA, D., MARCO. C., GARCIA-MARTINEZ, J., GARCIA-PEREGRIN, E. (1984) *Int. J. Biochem.* 16: 845-847.
- 252.- GONZÁLEZ-PACANOSWKA, D. (1983) Tesis doctoral. Granada
- 253.- DURR, I.F. and MURAD, M. (1971) *Int. J. Biochem.* 2: 249-258
- 254.- BHAT, S.G. and BROCKMAN, H.L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 486-492.
- 255.- FIELD, F.J. (1984) *J. Lipid Res.* 25: 389-399.
- 256.- BALASUBRAMANIAM, S. VENKATESAN, S. MITROPOULOS, K.A. and PETERS, T.J. (1978) *Biochem. J.* 174: 863-872.
- 257.- MATHUR, S.N. and SPECTOR (1982) *J. Lipid Res.* 23: 692-701.
- 258.- SUCKLING, K.E., BOYD, G.S. and SMILLE, C.G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 710: 154-163.
- 259.- NORUM, K.R., HELGERUD, P. and LILLJEQUIST, A.C. (1981) *ACAT Scand. J. gastroenterol.* 16: 401-410.
- 260.- FIELD, F.J. and MATHUR, S.N. (1983) *J. Lipid Res.* 24: 1049-1059.
- 261.- ROSS, A.C., GO, K.J., HEIDER, J.G. and ROTHBLAT, G.H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 815-819.

- 262.- HEIDER, J.G., PICKENS, C.E. and KELLEY, L.A. (1983)
J. Lipid res. 24: 1127-1134.
- 263.- SUCKLING, K.E., STANGE, E.F. and DIETSCHY, J.M. --
(1983) FEBS Lett. 151: 111-116.
- 264.- HAUGEN, R. and NORUM, K.R. (1976) Scand. J. Gastro-
enterology 11: 615-621.
- 265.- HELGERUD, SAAREM, K. and NORUM, K.R. (1981) J. Lipid
Res. 22: 271-277.
- 266.- FIELD, F.J., COOPER, A.D. and ERICKSON, S.K. (1982)
Gastroenterology 83: 873-880.
- 267.- HELLER, F.R. (1983) Lipids 18: 18-24.
- 268.- FIELD, F.J. and SALOME, R.G. (1982) Biochim. Biophys.
Acta 712: 557-570.
- 269.- TABACIK, C., ALIAN, S., ASTRUC, M. and CRASTES DE PAULET
A. (1981) Biochim. Biophys. Acta 666: 433-441.
- 270.- NORUM, K.R., HELGERUD, P., PETERSON, L.B., GROOT, P.H.E.
and DE JONGE, H.R. (1983) Biochim. Biophys. Acta 751:
153-161.
- 271.- HELGERUD, P., HAUGEN, R. and NORUM, K.R. (1982) Eur. J.
Clin. Invest. 12: 493-500.
- 272.- Instructions to authors (1985) J. Biol. Chem. 260: 1-11.
- 273.- MARCO, C., MORILLAS, L.G. and GARCIA PEREGRIN, E. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 875: 599-604.
- 274.- TANAKA, R.D., EDWARDS, P.A., LANG, S.F. and FOGELMAN, A.M.
(1983) J. Biol. Chem. 258: 13331-13339.
- 275.- DURR, I.F. and MURAD, M. (1971) Int. J. Biochem. 2: 249-
256.
- 276.- SUGANO, M., IDE, T., OKAMATSU, H. and TAKAHARA, H. (1977)
Biochim. Biophys. Res. Commun. 79: 1092-1097.
- 277.- SUCKLING, K.E. and STANGE, E.F. (1985) J. Lipid Res.
26: 647-671.

- 278.- RAUL, F., SIMON, P., KEDINGER, M. and HAFFEN, K. (1977)
Cell. Tiss. Res. 176: 167-178.
- 279.- SYLVEN, C. and NORDSTROM, C. (1970) Scand. J. Gastro-
enterol. 5: 57-63.
- 280.- LICHTENSTEIN, A.H. and BRECHER, P. (1980) J. Biol. --
Chem. 255: 9098-9104.
- 281.- STANGE, E.F., ALAVI, M., SCHNEIDER, A., DITSCHUNEIT,
H. and POLEY, M. (1981) J. Lipid Res. 22: 47-56.
- 282.- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L. and MITSCHELEN, J.J. --
(1976) Adv. Lipid Res. 14: 1-71.
- 283.- BRICKER, L.A., WEIS, H.J. and SIPERSTEIN, M.D. (1972)
J. Clin. Invest. 51: 197-204.
- 284.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) Lipids 11: 571-579.
- 285.- SYLVEN, C. and NORDSTROM, C. (1970) Scand. J. Gastro-
enterol. 5: 57-63.
- 286.- SKLAN, D. and BUDOWSKI, P. (1979) Lipids 14: 386-390.
- 287.- STRANDBERG, T.E., TILVIS, T.S. and MIETTINEN, T.A. --
(1983) Scand. J. Gastroenterol. 18: 1017-1023.
- 288.- BALASUBRAMANIAM, S., GOLDSTEIN, J.L., FAUST, J.R. and
BROWN, M.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2564
2568.
- 289.- ANDERSEN, J.M., TURLEY, S.D. and DIETSCHY, J.M. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 165-169.
- 290.- ALEJANDRE, M.J., RAMIREZ, H., SEGOVIA, J.L. and GAR-
CIA-PEREGRIN, E. (1985) Ann. Nutr. Metab. 29: 111-118.
- 291.- DAS, B.C. and GRAY, G.M. (1969) Biochim. Biophys. Acta
195: 255-257.
- 292.- SJOSTRAND, F.S. (1968) J. Ultrastruct. Res. 22: 424-442
- 293.- HARRER, D.S., STERN, B.K. and REILLY, R.W. (1964) -
Nature 203: 319-320.

- 294.- STERN, B.K. (1966) *Gastroenterology* 51: 855-864.
- 295.- EVANS, M., WRIGGLESWORTH, J.M., BURDETT, K. and POVER, W.F.R. (1971) *J. Cell Biol.* 51: 452-464.
- 296.- O'HEA, F.K. and LEVILLE, G.A. (1969) *Comp. Biochem. -- Physiol.* 30: 149-157.
- 297.- GALLO, L., NEWBILL, T., HYUN, J., VAHOUNY, G.V. and -- TREADWELL, C.R. (1977) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156: 277-281.
- 298.- NORUM; K.R., HELGERUD, P. and LILLJEQVIST, A.C. (1981) *Scand. J. Gastroenterol.* 16: 401-410.
- 299.- SPECTOR, A.A., MATHUR, S.N. and KADUCE, T.L. (1979) --- *Prog. Lipid Res.* 18: 31-53.
- 300.- WATT, S.M. and SIMMONDS, W.J. (1981) *J. Lipid Res.* 22: 157-165.
- 301.- GEBHARD, R.L., STONE, B.G. and PRIGGE, W.F. (1985) *J. Lipid Res.* 26: 47-53.
- 302.- KESSLER, J.I., STEIN, J., DANNACKER, D. and NARCESSIAN, P. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 5281-5288.
- 303.- JONES, A.L. and OCKNER, R.K. (1971) *J. Lipid Res.* 12: 580-589.
- 304.- DANNEVIG, B.H. and NORUM, K.R. (1983) *Comp. Biochem. - Physiol.* 74B: 243-250.
- 305.- NORUM, K.R., LILLJEQVIST, A.C., HELGERUD, P., NORMANN, E.R., MO, A. and SELBEKK, B. (1979) *Eur. J. Clin. Invest.* 9: 55-62.
- 306.- HEROLD, G., SCHNEIDER, A., DITSCHUNEIT, H. and STANGE, E.F. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 796: 27-33.
- 307.- SKLAN, D., BUDOWSKI, P., ASCARELLI, I. and HURWITZ, S. (1973) *J. Nutr.* 103: 1299-1305.
- 308.- McINTYRE, N. and ISSELBACHER, K.J. (1973) *Amer. J. Clin. Nutr.* 26: 647-656.

- 309.- SLAKEY, L.L., CRAIG, M.G., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., --
FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESHI, A.A., SUBBA--
RAYAN, C. and PORTER, J.W. (1972) J. Biol. Chem. 247:
3014-3021.
- 310.- HO, K. J. (1976) Am. J. Clin. Nutr. 29: 187-195.
- 311.- ERICKSON, S.K., SHREWSBURY, M.A., BROOKS, C. and MEYER,
D.J. (1980) J.Lipid Res. 21: 930-941.
- 312.- DREVON, C.A., WEINSTEIN, D.B. and STEIMBERG, D. (1980)
J. Biol. Chem. 255: 9128-9137.
- 313.- STANGE, E.F. and DIETSCHY, J.M. (1985) J. Lipid Res. -
26: 175-184.
- 314.- ALEJANDRE, M.J., ZAFRA, M.F., RAMIREZ, H., SEGOVIA, J.
L. and GARCIA-PEREGRIN, E. (1985) Int. J. Biochem. 17:
835-838.
- 315.- MARCO, C., GONZALEZ-PACANOWSKA, D., SEGOVIA, J.L. and
GARCIA-PEREGRIN, E. (1986) Biochim. Biophys. Acta (En
prensa-RPL 8566-).
- 316.- MARCO, C., MORILLAS. L.G., SEGOVIA, J.L. and GARCIA-
PEREGRIN, E. (1986) Int. J. Biochem. 18: 223-227.