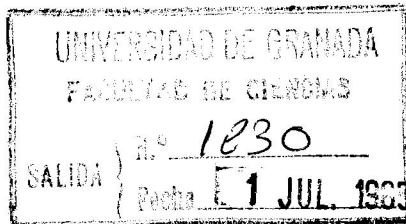


R. 56. 481



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



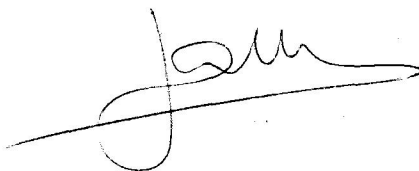
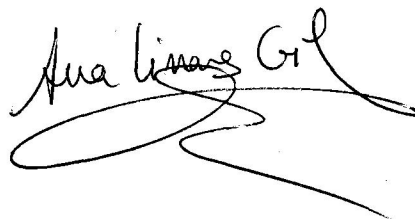
"REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES  
Y COMPUESTOS NO ESTEROÍDICOS A PARTIR DE  
MEVALONATO COMO PRECURSOR COMÚN"

Juan Antonio Aguilera Mechón

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1985

*Tesis doctoral dirigida por los Dres. D. Eduardo García Peregrín y D<sup>a</sup> Ana Linares Gil, Catedrático y Profesora Titular del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada. Fue leída el día 21 de Junio de 1985 ante el tribunal formado por los Profesores: de la Higuera González, Granada; Medina Jiménez, Salamanca; Benito de las Heras, Madrid; Segovia Parra, Granada y Ramírez Rodrigo, Granada. Obtuvo la calificación de apto "cum laude".*





## RECONOCIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. Eduardo García Peregrín, por la gran ilusión y empeño que ha puesto en la dirección de este trabajo.

A la Prof. Dra. D<sup>a</sup> Ana Linares Gil, codirectora de esta Tesis.

Entre los compañeros que me han ayudado, quiero citar, en primer lugar, a Víctor Arce Fraile, con quien he compartido cientos de horas de trabajo en las que hemos puesto orden/desorden a todo lo divino y lo humano (incluyendo a las humanas divinas, con perdón). Asimismo han colaborado en este trabajo otros compañeros entrañables como Guillermo Caamaño Olivares, Felipe Rodríguez Vico, Juan Antonio Enríquez Morón y la Dra. Carmen Marco de la Calle. He recibido un apoyo excepcional de las sugerencias, el trabajo, el estímulo y -por qué no decirlo- el encanto de Virginia García Molina.

Muchas gracias a todos aquellos que, en el Departamento (como los Drs. Josefa L. Segovia, Hilario Ramírez, Alberto Vargas y Dolores González Pacanowska, por una parte, y D<sup>a</sup> Dolores Maldonado y D<sup>a</sup> Virtudes del Pozo, por otra) o fuera de él (no quiero dejar de expresar mi gratitud y afecto por D. Francisco Montero y por D. Manuel Vedia) me han ofrecido su ayuda de alguna forma.

Por fin, creo que es el mejor momento para rendir un homenaje de cariño y admiración hacia algunos de mis maestros y profesores de Instituto, verdaderamente extraordinarios, que contribuyeron de manera decisiva a mi formación. Recuerdo especialmente a dos de ellos: D<sup>a</sup> Natividad García Alonso y D. Antonio Jiménez Jiménez.

A mi padre/compinche,  
muy especialmente.

A mi madre.

A Virginia.

## ABREVIATURAS

ATP	Adenosín 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
c. p. m.	Cuentas por minuto
d. p. m.	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-diaminotetraacético
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG	Acido 3-hidroxi-3-metilglutárico
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LNS	Lípidos insaponificables
LNSP	Lípidos no saponificables polares
LS	Lípidos saponificables
LNSP	Lípidos no saponificables polares
MEM	Medio esencial mínimo
MVA	Acido mevalónico
NADP	Fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
POPOP	2, 2'-p-fenilen bis-(5-feniloxazol)
PPO	2, 5-difeniloxazol
r. p. m.	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
VLDL	Lipoproteínas de densidad muy baja

## INDICE

	Página
INTRODUCCION : LA ENCRUCIJADA DEL MEVALONATO.....	21
Metabolismo del mevalónico circulante.....	34
Regulación del metabolismo del mevalonato.....	36
Importancia cuantitativa del metabolismo del mevalonato.....	40
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	45
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	51
I. MATERIAL.....	53
1. Material biológico.....	53
2. Aparatos e instrumentación.....	54
3. Reactivos.....	55
II. MÉTODOS.....	56
1. Metabolismo "in vivo" del mevalonato.....	56
1.1. Administración del mevalonato.....	56
1.2. Medida del $^{14}\text{CO}_2$ .....	56
1.3. Extracción y medida de los lípidos insaponificables y saponificables marcados.....	57
1.4. Fraccionamiento de los lípidos in- saponificables.....	59
2. Metabolismo "in vitro" del mevalonato.....	61
2.1. Incubación.....	61
2.2. Medida del $^{14}\text{CO}_2$ .....	62

2.3. Medida de los lípidos insaponificables y saponificables marcados.....	62
3. Incorporación "in vitro" de lípidos insapo- nificables.....	64
4. Precipitación con digitonina.....	65
5. Determinación de los niveles de colesterol.....	66
5.1. En hígado, riñones y encéfalo.....	66
5.1.1. Extracción de lípidos.....	66
5.1.2. Determinación de colesterol total.....	67
5.1.3. Determinación de colesterol libre y esterificado.....	67
5.2. En plasma.....	70
5.2.1. En plasma completo.....	70
5.2.2. En las HDL y en VLDL-LDL.....	71
6. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa en hepatocitos.....	73
6.1. Obtención de los hepatocitos.....	73
6.2. Incubación de los hepatocitos con lípidos insaponificables polares.....	74
6.3. Extracción de microsomas de los hepatocitos.....	74
6.4. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa.....	75
7. Tratamiento de los datos.....	77

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
I. PUESTA A PUNTO DE LOS MÉTODOS:	
ESTUDIOS CINÉTICOS.....	79
1. Puesta a punto del método de estudio	
"in vivo" de la incorporación del me-	
valonato.....	82
1. 1. Influencia de la cantidad de MVA	
inyectada.....	83
1. 2. Influencia del tiempo.....	91
2. Distribución tisular del metabolismo	
del mevalonato circulante.....	104
3. Puesta a punto del método de estudio	
"in vitro" de la incorporación de me-	
valonato.....	107
3. 1. Influencia del peso del tejido.....	107
3. 2. Influencia de la concentración	
de mevalonato.....	107
3. 3. Influencia del tiempo de incuba-	
ción.....	117
II. CONTROL DEL METABOLISMO DEL MEVA-	
LONATO POR LA RUTA DE ESTEROLES Y	
POR LA RUTA CETOGENICA.....	122
1. Estudio de la evolución postnatal del	
contenido en colesterol; efecto de una	
dieta con un 2% de colesterol.....	122
1. 1. En el hígado.....	122
1. 2. En los riñones.....	128

1. 3. En el encéfalo . . . . .	130
1. 4. En el suero . . . . .	133
2. Estudios sobre el metabolismo del mevalonato por la ruta de esteroides "in vitro" . . . . .	146
2. 1. Evolución postnatal de la incorporación de mevalonato por cortes de hígado y de riñón . . . . .	146
2. 2. Efecto de una dieta rica (2%) en colesterol sobre el metabolismo "in vitro" del MVA por la ruta de esteroides en hígado y riñón . . . . .	147
3. Estudios sobre el metabolismo del mevalonato por la ruta de esteroides "in vivo" . . . . .	155
3. 1. Estudio "in vivo" del control de la incorporación de mevalonato a distintos lípidos insaponificables en hígado . . . . .	155
3. 1. 1. Evolución postnatal . . . . .	155
Caracterización de los compuestos marcados de naturaleza desconocida . . . . .	160
Secuencia de los cambios hepá- ticos en las actividades coles- terogénicas tras la eclosión del pollo . . . . .	164
3. 1. 2. Efecto de la ingesta de colesterol sobre la evolución postnatal . . . . .	167
Caracterización de compuestos . . . . .	171
Hipótesis de los oxisteroides . . . . .	174

Demostración del acúmulo "in vivo" de oxiesteroles que presumiblemente inhiben la actividad HMG-CoA reductasa, no derivados del colesterol; un modelo de regulación múltiple y secuencial que involucra a derivados polares del lanosterol....	178
3. 2. Estudio "in vivo" del control de la incorporación de mevalonato a distintos lípidos insaponificables en riñón.....	182
3. 2. 1. Evolución postnatal.....	182
3. 2. 2. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta.....	190
3. Cambios en la actividad de la ruta cetogénica del mevalonato tras la eclosión; efecto de la ingestión de colesterol.....	194
III. OTROS ESTUDIOS.....	199
1. Suministro neonatal de colesterol como factor antihipercolesterolémico. Hipótesis de Reiser...	199
2. Variaciones diurnas en el metabolismo del mevalonato.....	210
3. Influencia del ayuno sobre el metabolismo del mevalonato.....	216
3. 1. Efecto de 42 horas de ayuno sobre el metabolismo del mevalonato en hígado y riñones de pollos de 11 días.....	217
3. 1. 1. Influencia sobre las actividades hepáticas.....	217



3.1.2. Influencia sobre las actividades renales .....	220
3.2. Efecto de 12 horas de ayuno nocturno sobre el metabolismo del mevalonato en hígado y riñones de pollos de 11 días .....	222
3.3. Variaciones diurnas de los niveles de colesterol .....	225
3.3.1. En hígado .....	225
3.3.2. En riñones .....	228
3.3.3. En suero .....	228
CONCLUSIONES .....	237
REFERENCIAS .....	243

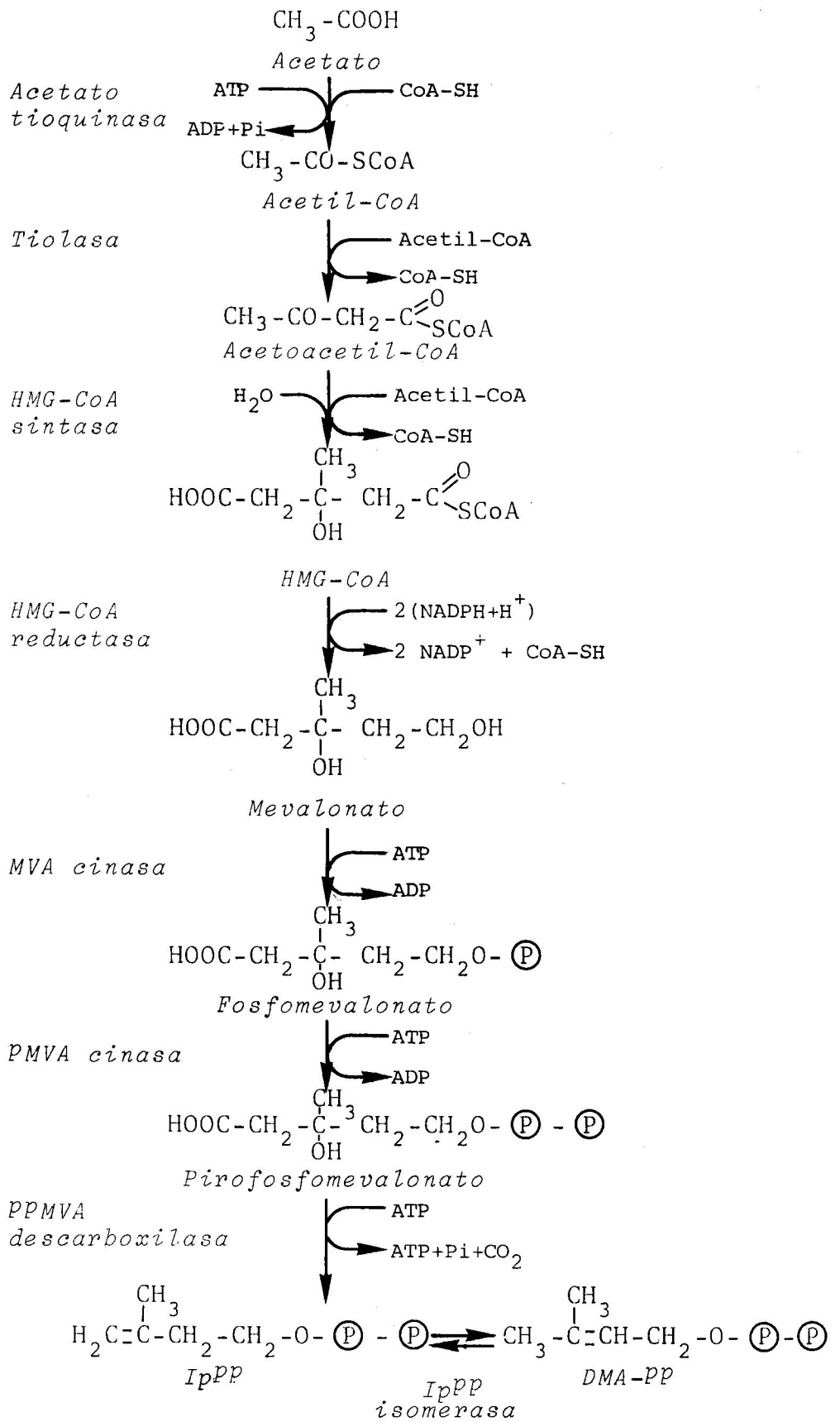
INTRODUCCION: LA ENCRUCIJADA DEL MEVALONATO

## INTRODUCCION: LA ENCRUCIJADA DEL MEVALONATO

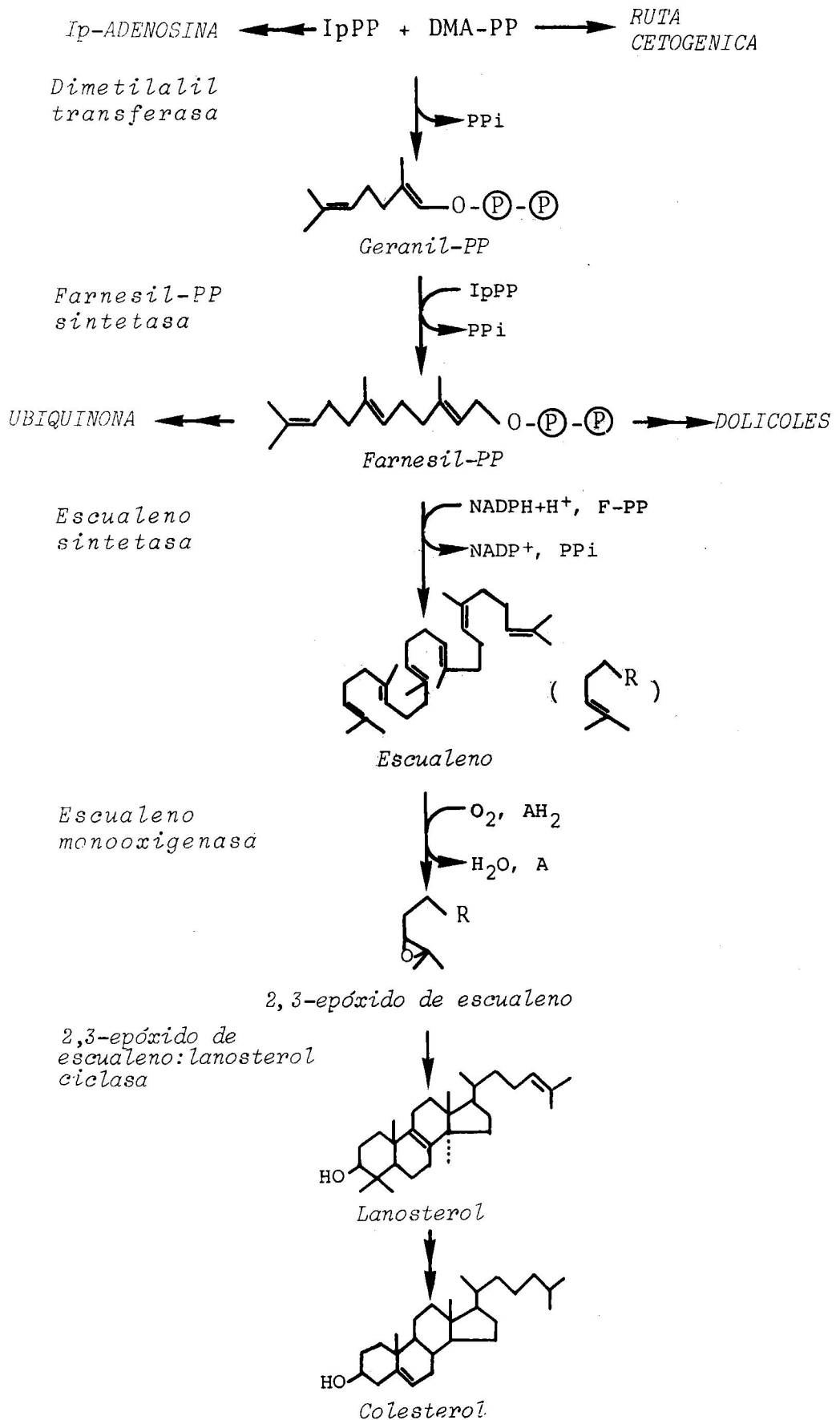
En el modelo de regulación de la colesterogénesis que hasta hace poco tiempo se ha venido manejando, se consideraba que la modulación de la actividad HMG-CoA reductasa<sup>1</sup> de hígado e intestino -los tejidos que más colesterol sintetizan- daba cuenta por sí sola de aquélla, aunque se conocían otros puntos de la ruta que respondían, mucho más suavemente, a las situaciones en que se ve modificada la velocidad de síntesis de colesterol. Si bien ese papel predominante de la HMG-CoA reductasa generalmente, pero no siempre (Fears y Morgan 1976, Fears 1978), es cierto, el modelo era insuficiente como hipótesis explicativa si se ampliaba el campo de visión. Ello es debido a que el producto de la reacción catalizada por la reductasa, el MVA (véase el esquema 1), no sólo es precursor del colesterol, sino también -y considerando solamente los animales- de los dolicoles, de la cadena isoprenoide de las ubiquinonas, del resto isoprenoide de la isopentenil-adenosina, del resto farnesil del hemo a en la citocromo oxidasa, y quizás (Schmidt y col. 1982) de otro compuesto implicado en el mantenimiento de la forma celular (en el sentido más estricto).

Tal diversidad de alternativas "importantes" a disposición de los átomos de C del MVA hace sospechar que el control de los niveles de intermediarios comunes a varias rutas debe ser más fino. Más aún tras mostrar LaPorte y col. (1984) la drástica influencia -con la consiguiente potencialidad reguladora- que, en los puntos de bifurcación,

<sup>1</sup> Diversos aspectos de la regulación de esta enzima han sido revisados por Schroepfer (1981), Brown y Goldstein (1976, 1979), Dugan (1981), Rodwell y col. (1973, 1976), Kandutsch y col. (1978), Beg y Brewer (1981), Gibson y col. (1982) y Chang (1983).



Esquema 1 (a). Ruta de biosíntesis de esteroides.



Esquema 1 (b). Ruta de biosíntesis de esteroides.

puede tener la actividad enzimática marcadora del ritmo de una ruta sobre la actividad correspondiente de la/s otra/s. Pensemos en el caso que se presenta cuando se ingiere una dieta rica en colesterol. En tal situación se inhibe la actividad reductasa (Rodwell y col. 1973) y, de no existir otros mecanismos compensatorios, se inhibiría de forma seguramente indeseable la génesis de los productos de las otras rutas alternativas del MVA.

De hecho, se ha comprobado que la actividad reductasa puede disminuir muchísimo tras una copiosa entrada de colesterol en las células (por ej., cuando la ingesta de colesterol es alta), pero nunca hacerse por este solo efecto nula (Brown y col. 1978, Faust y col. 1979a, Brown y col. 1974). Cabe pensar que la actividad residual debiera ser suficiente para un suministro adecuado de MVA como sustrato de las rutas alternativas, lo que conlleva la necesidad adicional de impedir al MVA seguir principalmente la ruta de esteroides. Esto se conseguiría si existieran otro/s punto/s de regulación de la vía colesterogénica que permitieran mantener niveles suficientes de los compuestos de los puntos de bifurcación. Veamos qué se sabe sobre esto.

#### Regulación de las rutas no-esteroidicas del MVA.

Hoy sabemos, gracias sobre todo a los trabajos de Goldstein y Brown (Brown y Goldstein 1983, Goldstein y Brown 1977), cómo penetra el colesterol en las células. Las LDL e IDL circulantes, reconocidas por receptores específicos localizados en la membrana de todas las células, y los remanentes de quilomicrones, reconocidos por otro tipo de receptores exclusivamente hepáticos, penetran en el interior celular por endocitosis. Por la actividad lisosomal, liberan colesterol no esterificado que, por un mecanismo desconocido, provoca una inhibición de la síntesis de nuevos receptores de LDL e IDL, un incremento

de la actividad acil-CoA-colesterol acil transferasa (el colesterol esterificado es la forma de almacenamiento celular) y una inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa. ¿Cómo afecta esto a la síntesis de los productos de las rutas alternativas del MVA?.

Los estudios sobre el control de estas rutas tropiezan con la dificultad técnica de medir las variaciones de los bajos niveles de actividad reductasa. Se solucionó mediante el empleo de compactina, un inhibidor competitivo de la reductasa. Cuando un cultivo de células crece en presencia de compactina, la actividad reductasa decrece rápidamente y tiene lugar una inducción de la síntesis de enzima que se manifiesta por dilución de la compactina (Brown y col. 1978, Edwards y col. 1980, Chin y col. 1982, Chin y Chang 1982).

Cuando Brown y col. (1978) añadieron niveles saturantes de LDL a cultivos de fibroblastos incubados con compactina, la actividad inducida HMG-CoA reductasa se inhibió un 85%. La inhibición era casi total sólo si adicionaban MVA al medio de cultivo. Tales observaciones llevaron a estos autores a desarrollar el concepto de regulación "feedback" multivalente de la HMG-CoA reductasa, que implica a las LDL y a uno o varios metabolitos no esteroídicos del MVA (Brown y Goldstein 1980).

El efecto inhibitor del MVA no se reproduce por adición a los cultivos de escualeno, ubiquinona o dolicol, pero sí por la presencia de isopenteniladenosina, un componente del isopentenil-tRNA (Brown y Goldstein 1980). Asimismo, se ha demostrado la necesidad de un metabolito no esteroídico del MVA para la replicación del DNA y el crecimiento celular que probablemente sea isopenteniladenosina o algún derivado suyo (Goldstein y col. 1979, Kaneko y col. 1978, Habenicht y col. 1980, Quesney-Huneus y col. 1980, Siperstein 1984).

Si, como parece inferirse de los resultados de Brown y Goldstein, la ubiquinona y el dolicol no participan en la retroinhibición multivalente de la reductasa, ¿cómo se contrarresta la disminución de su síntesis provocada por el efecto del colesterol?

Una supresión del 90% de la actividad reductasa reduce aparentemente la síntesis de ubiquinona en menor grado, entre menos de un 20% (Faust y col. 1979a) y un 35% (Nambudiri y col. 1980, Ranganathan y col. 1981). El punto de divergencia de la ruta de esteroides que conduce a la formación de la cadena poliprenoide de la ubiquinona parece ser el farnesil-PP. Según Faust y col. (1979b), la adición de LDL a cultivos de fibroblastos inhibe la biosíntesis de colesterol, tras la supresión de la actividad reductasa, a nivel de la síntesis de escualeno a partir de farnesil-PP y quizá en otros puntos posteriores, lo que permite que continúe a buen ritmo la síntesis de ubiquinona a pesar de una gran reducción de la producción de MVA. Eso explicaría que la síntesis de ubiquinona en hígado de rata se inhiba relativamente poco (Ranganathan y Ramasarma 1975) o nada (Rao y Olsen 1967) tras la adición de colesterol a la dieta. No obstante, al menos algunos de los resultados publicados están en cuarentena por la posibilidad recientemente señalada de que una parte considerable de la radiactividad asignada a la ubiquinona en las experiencias de incorporación de un sustrato marcado corresponda en realidad a un óxido de escualeno (Sexton y col. 1983).

La regulación de la síntesis de dolicoles y la propia ruta biosintética se conocen muy poco, a pesar de haberse descubierto recientemente la importancia clave de estos compuestos para la función celular, especialmente durante el desarrollo cerebral (James y Kandutsch 1980a), a lo largo del desarrollo embrionario (Carson y Lennarz 1981) y en la espermatogénesis (James y Kandutsch 1980b). En todos los casos,



los dolicoles parecen involucrados como portadores de las cadenas oligosacáridicas durante la síntesis de glucoproteínas.

El último precursor común de los dolicoles y del colesterol es el farnesil-PP. Parece ser que la ruta del dolicol se satura a menores concentraciones de intermediarios que la síntesis de colesterol (que exhibe, además, una velocidad más de 100 veces superior). Esto parece que permite que la síntesis de dolicol pueda mantenerse si la reductasa no se reprime completamente (James y Kandutsch 1979), e incluso puede aumentar si una inhibición de la escualeno sintetasa conduce a un acúmulo de farnesil-PP. Esto explicaría que la adición de colesterol a la dieta aumente, según algunos autores (Tavares y col. 1981), la síntesis de dolicol y la glucosilación de proteínas. Para otros (James y Kandutsch 1980a) disminuye la primera pero no se afecta la incorporación de manosa a glucoproteínas.

La regulación de las rutas comentadas hasta ahora se conoce mal, es cierto, pero al menos se sabe para qué sirven -esto es, la utilidad de los productos finales respectivos-. Por desgracia, no siempre puede decirse lo mismo.

#### La enigmática ruta cetogénica del mevalonato

En 1974, Edmond y Popják demostraron que, en ratas recién nacidas, el (2-<sup>14</sup>C)MVA inyectado podía servir no sólo como precursor de esteroides -y de las rutas alternativas mencionadas- sino (sorprendentemente) también de ácidos grasos de cadena larga. El acúmulo de ácidos grasos marcados era proporcionalmente mayor en los tejidos de origen ectodérmico cerebro, médula espinal y piel. Como quiera que en las ratas jóvenes -con mielinización activa- el 3-hidroxiacetato y el acetoacetato son los principales "combustibles" del sistema nervioso central (Hawkins y col. 1971) y, como el propio

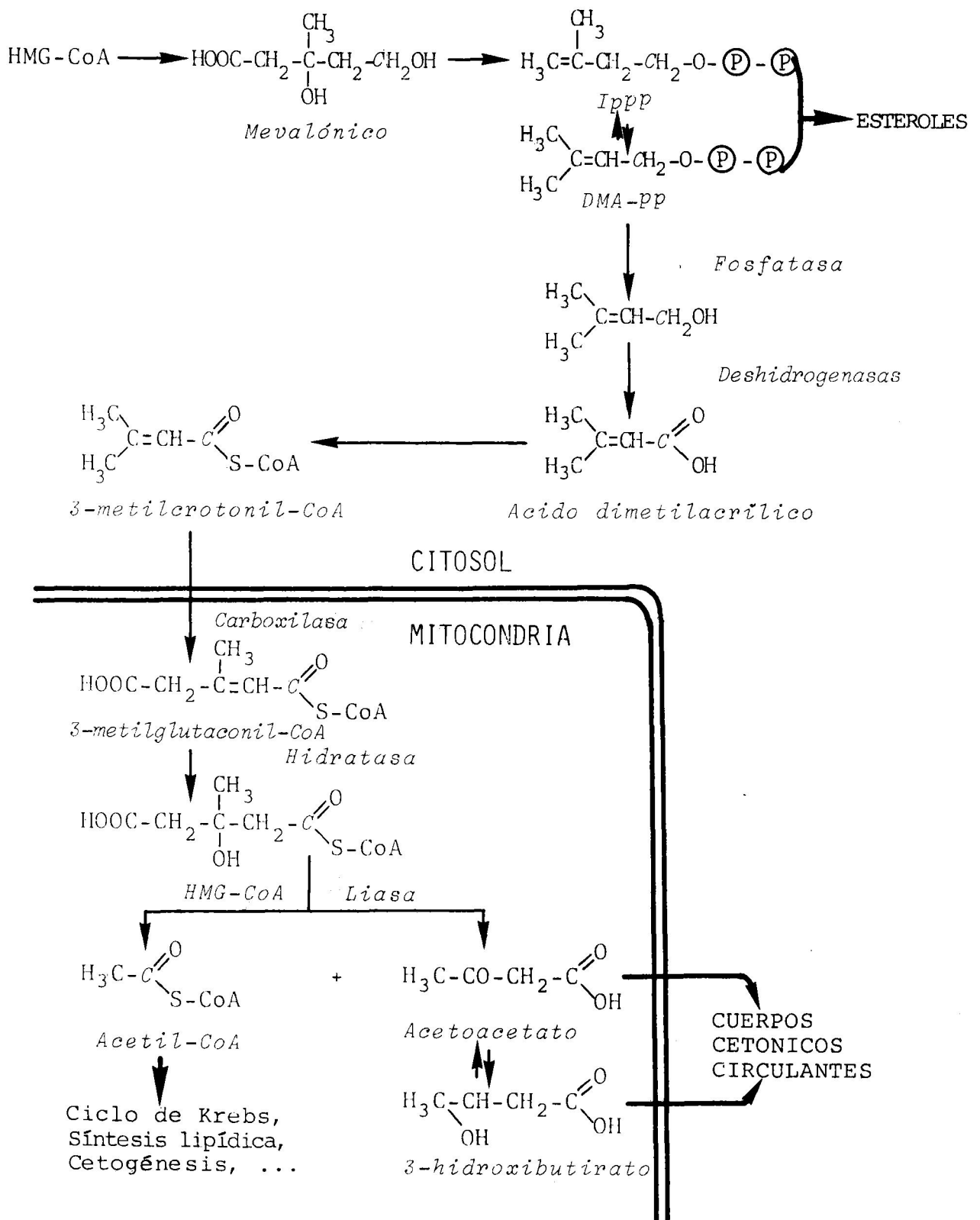
Edmond (1974) había demostrado, también se incorporan en los ácidos grasos y esteroides preferentemente por el cerebro, médula espinal y piel -mínimamente por el hígado-, Edmond y Popják (1974) sugirieron que el  $^{14}\text{C}$  del MVA iba a parar a HMG-CoA, el cual era roto en las mitocondrias por la HMG-CoA liasa produciendo ( $^{14}\text{C}$ )acetoacetato y acetil-CoA no marcado. El cerebro, la médula espinal y la piel utilizarían con especial rapidez este ( $^{14}\text{C}$ )acetoacetato formado en otros tejidos -ya que "in vitro" no se produce en aquellos la incorporación a ácidos grasos-.

En el mismo artículo, Edmond y Popják analizaron tres posibles caminos por los que el  $^{14}\text{C}$  del (2- $^{14}\text{C}$ )MVA puede ser reciclado a HMG-CoA. De ellas, la que consideraban más plausible, una modificación de una hipótesis anterior de Popják (1970, 1971), se ha visto muy reforzada por trabajos posteriores (Brady y col. 1982) y se muestra en la figura 2 (la localización intracelular de los intermediarios es la postulada por Weinstock y col. en 1984). Como puede apreciarse, el punto de desvío de la ruta de esteroides se produce por una hidrólisis del ester pirofosfato del dimetilalilpirofosfato por acción de una/s fosfatasa/s del retículo endoplasmático.

---

Aunque esta ruta suele denominarse "derivación del MVA vía el transmetilglutaonato", la "ruta derivación del MVA" o "ruta de no esteroides" (como si fuera la única), nos parece que un apelativo más adecuado por lo corto e inequívoco podría ser el de "ruta cetogénica del MVA".

En el esquema 2 puede seguirse el destino de los átomos de C del MVA. Como el C-5 (en cursivas) va a parar a la posición 1 del acetil-CoA, si aquél estuviese marcado originaría  $\text{CO}_2$  marcado tras la entrada del acetil-CoA en el ciclo de Krebs. Por su parte,



Esquema 2 . Ruta cetogénica del mevalónico.

el C-2 del MVA se convierte en el C-2 del acetoacetato y, en las propias mitocondrias (del mismo tejido o de otro), en el C-2 del acetil-CoA (por la acción consecutiva de la transferasa del 3-cetoacil-CoA y de la tiolasa).

Con ese fundamento, se ha empleado la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA o (2- $^{14}\text{C}$ )MVA como un índice de la actividad de la ruta cetogénica "in vivo" e "in vitro". "In vivo", el  $^{14}\text{CO}_2$  espirado (a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA, por ej.) da idea de la actividad global de la ruta. Fue medido por vez primera por Fogelman y col. (1975) en ratas macho y en hombres, observándose que representaba un porcentaje elevado del  $^{14}\text{C}$  del (R)-(5- $^{14}\text{C}$ )MVA (el enantiómero metabólicamente activo): nada menos que un 13% a los 100 minutos en la rata y un 12% a las 24 horas en el hombre.

La medida del  $^{14}\text{CO}_2$  producido "in vitro" (Righetti y col. 1976) permite detectar la actividad de la ruta cetogénica en los tejidos que, como el renal (Chernick y col. 1950), sintetizan ácidos grasos muy pobremente.

Sin embargo, hay que hacer notar que esta medida de la actividad de la ruta cetogénica no es óptima. Como apuntan Kopito y col. (1984), no todo el acetil-CoA marcado origina  $^{14}\text{CO}_2$  (por ej., la conversión en riñones perfundidos de rata es aproximadamente del 34% (Tomera y col. 1983)), pues puede también incorporarse a lípidos y -en el hígado- a cuerpos cetónicos. En segundo lugar, no todo el  $^{14}\text{CO}_2$  se mide, debido a que parte de él puede ser atrapado mediante procesos de intercambio en compuestos no volátiles en medio ácido. Por consiguiente, hay que interpretar con cautela las diferencias aparentes de actividad entre tejidos. Asimismo el efecto del ayuno y la diabetes cetónica sobre la actividad de la ruta cetogénica se verá

distorsionado porque probablemente una mayor cantidad de acetil-CoA se transformará en cuerpos cetónicos. Muy recientemente se han atenuado estos inconvenientes mediante la estima, en órganos perfundidos, de la proporción de (1-<sup>14</sup>)acetil-CoA mitocondrial que origina <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, aunque esta estima puede en ocasiones no dar cuenta de la distribución celular de la producción de acetil-CoA por la ruta cetogénica (Kopito y col. 1984, Weinstock y col. 1984).

A pesar de todo, no se ha encontrado un método mejor. El recientemente descrito (Brady y col. 1982) que cuantifica la actividad de la ruta cetogénica como la diferencia entre el metabolismo global del MVA y su incorporación a lípidos insaponificables, realmente mide no sólo la síntesis de los intermediarios de la ruta cetogénica, sino además los de la ruta de esteroides no solubles en éter de petróleo (es decir, los precursores de escualeno) así como los intermediarios de otras rutas. Por último, la cuantificación de la actividad cetogénica a partir del MVA mediante la producción de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O a partir de (5-<sup>3</sup>H) MVA (Kopito y col. 1984), además de no medir los productos finales de la ruta exclusivamente, tiene el inconveniente de que el <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O se reincorpora a su vez a los productos de la ruta de esteroides -de hecho, se utiliza la incorporación de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O a (<sup>3</sup>H)colesterol como la mejor medida de la colesterogénesis total (Dietschy y Spady 1984).

Hechas estas salvedades metodológicas, veamos qué se ha conseguido averiguar sobre el destino del MVA circulante y su regulación.

### Metabolismo del MVA circulante

Cuando se comenzó a estudiar el destino metabólico del MVA circulante se encontró inesperadamente que, en ratas (Elwood y Van Bruggen 1961, Duncan y Best 1963, Hellström y col. 1973), gerbils y hamsters (Gans y col. 1973), los riñones convertían más MVA en lípidos insaponificables y colesterol que el hígado. Desde entonces, casi todos los estudios realizados "in vitro" o "in vivo" sobre mamíferos han confirmado el papel predominante de los riñones en el metabolismo del MVA circulante, no sólo por la ruta de esteroides, sino también -y más contundentemente- por la cetogénica (Edmond y col. 1976, Righetti y col. 1976, Johnson y col. 1976, Bardenheier y Popják 1977, Wiley y col. 1977a, Wiley y col. 1977b, Linder y Beitz 1978).

En cortes de tejido, Righetti y col. (1976) mostraron que el riñón de rata producía más de 20 veces más  $^{14}\text{CO}_2$  que cualquier otro tejido ensayado a partir de  $(2-^{14}\text{C})\text{MVA}$  o  $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$  (en este caso, la incorporación renal a esteroides fue similar a la hepática). Concluyeron que los glomérulos y túbulos renales son reponsables de la actividad cetogénica en una relación aproximada 7:3, mientras que, como ya habían informado Raskin y Siperstein (1974), la actividad esteroidogénica a partir de MVA se debía casi exclusivamente (un 95%) a la actividad glomerular.

Sin embargo, las técnicas "in vitro", como su propio nombre hace temer, presentan fragilidades derivadas del aislamiento de un subsistema de su entorno fisiológico. En concreto, los cortes de un órgano metabolizan muchos sustratos a velocidades bastante inferiores a las que exhibe el órgano "in vivo" o perfundido (Krebs 1968). La velocidad de conversión de  $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$  en productos lipí-

dicos es unas 100 veces mayor en riñón perfundido que en cortes renales (Brunengraber y col. 1978). Y quizás no sea eso lo peor: el acceso del sustrato al tejido puede ser esencialmente distinto. Esto parece ocurrir en el caso que nos ocupa, puesto que, contrariamente a lo que ocurría "in vitro", Edmond y col. (1976) demostraron que, "in vivo", la conversión de MVA en escualeno y esteroides se realiza en los riñones casi totalmente por los túbulos contorneados proximales y distales.

"In vivo", el predominio del riñón en el metabolismo del MVA circulante es claro. Así, la nefrectomía reduce la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  exhalada por las ratas adultas (tras la administración de  $(^{14}\text{C})\text{MVA}$ ) a menos de la mitad, mientras que la incorporación extrarenal a esteroides aumenta considerablemente, compensando la pérdida de la actividad de los riñones (Edmond y col. 1976, Wiley y col. 1977a). En ratas lactantes de 13 días ocurre lo mismo (Wiley y col. 1977a). El dicromato potásico, una toxina renal, provoca cambios similares (Johnson y col. 1976).

Pero como es natural, el que el metabolismo renal del MVA tenga mucha o poca importancia depende de su contribución cuantitativa a la síntesis total de esteroides (dependiente a su vez de la producción de MVA circulante) y de cómo esté -si es que lo está- regulado.

### Regulación del metabolismo del mevalonato

Se conoce muy mal. Empezando por el retrocontrol, el colesterol de la dieta inhibe, aunque en menor grado que a la actividad reductasa (y, como en su caso, por un mecanismo incógnito), la incorporación de MVA a colesterol en hígado (Gould y Swyryd 1966, Rao y Olsen 1967), pero hay controversia en cuanto a las etapas afectadas.

Una inhibición por el colesterol exógeno de la conversión de MVA en escualeno, y de escualeno en colesterol, explicaría, según Shah (1973), el gran incremento hepático en la incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales y a esteroides precipitables con digitonina encontrado por este autor tras el destete de las ratas. Como cabía esperar de ser cierta esa hipótesis, la adición de un 1% de colesterol a la dieta de las ratas elimina el incremento post-destete de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables y a esteroides, y de escualeno a esteroides (Johnson y Shah 1974).

La inhibición de la colesterogénesis a partir de MVA se ha corroborado en cultivos de fibroblastos tras la adición de LDL (Faust y col. 1979a, Nambudiri y col. 1980). En definitiva, es clara la existencia de una retroinhibición post-reductasa, cuya posible función en la regulación de las rutas colaterales ya la discutimos. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto del colesterol dietario o de las LDL sobre la ruta cetogénica del MVA.

Lo mismo puede decirse acerca del efecto del ayuno, otra situación inhibidora de la incorporación de MVA a colesterol (Slakey y col. 1972), al llevar consigo un descenso de actividad PPMVA descarboxilasa (González Pacanowska 1983) y de la conversión de escualeno en colesterol (Wiss y Wiss 1977a); no



se conoce su influencia sobre la ruta cetogénica del MVA. En el caso del ayuno hay una razón de peso: la medida de la actividad cetogénica por el  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido podría resultar distorsionada por los cambios de actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de los cuerpos cetónicos.

Otro de los factores que condicionan importantes cambios de actividad colestero génica, el ciclo luz-oscuridad (Rodwell y col. 1973), no sólo no se sabe cómo afecta a la ruta cetogénica, sino que su influjo sobre la que conduce a esteroides no está nada claro. Para algunos autores (Bhat y Ramasarma 1977, 1979) existe ritmo diurno en la rata con un máximo de incorporación de MVA a esteroides hacia la mitad del período oscuro -en el que comen, normalmente-. Pero según otros autores (Slakey y col. 1972, Jabalquinto y Cardemil 1980) tal ritmo es una quimera.

En este panorama desolador sólo encontramos un pequeño oasis, los estudios sobre influencias hormonales. Tanto en ratas como en humanos, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por la ruta cetogénica es unas dos veces mayor en las hembras (Feingold y col. 1979, Feingold y col. 1980c, Wiley y col. 1979). En la rata, además, el macho incorpora MVA a colesterol más activamente que la hembra (Wiley y col. 1979). Estos estudios, junto a los de Kopito y col. (1984), señalan a los riñones como responsables de las diferencias por ambas rutas. Los riñones de ratas hembras perfundidos con cantidades fisiológicas de MVA, no sólo captan MVA a una velocidad un 27% menor que la de los riñones de ratas machos, sino que metabolizan el MVA globalmente y por la ruta de esteroides un 27-30% más lentamente, mientras que producen un 40% más de  $^{14}\text{CO}_2$  (Kopito y col. 1984). En los niño-

nes femeninos las reacciones de ciclación del escualeno y de desmetilación del lanosterol parecen ser menos activas (Wiley y col. 1979). Como cabía esperar, la nefrectomía elimina las diferencias en la oxidación del MVA a  $\text{CO}_2$  (Wiley y col. 1979).

Tales diferencias de actividad se deben lógicamente a la actividad de las hormonas sexuales: la testosterona inhibe la actividad cetogénica a partir de MVA mientras que los estrógenos la activan -si bien con menor intensidad- (Wiley y col. 1979, Brady y col. 1983). Se han relacionado (Dembic y Sabolic 1982) estos efectos con la activación estrógeno-dependiente de la actividad alcohol deshidrogenasa (cinco veces mayor en las hembras) de la corteza renal de rata, en el sentido de que esto podría inducir una más rápida oxidación del dimetilalcohol. En cualquier caso no hay una buena correlación entre las actividades alcohol deshidrogenasa y de cetogénesis a partir de MVA (Brady y col. 1983).

También se ha encontrado que los riñones perfundidos de ratas hembras producen  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (2- $^{14}\text{C}$ )-2-cetoisocaproato con una velocidad un 36% mayor que los riñones de los machos. Por consiguiente, la diferencia de actividad cetogénica -partiendo de MVA- también puede deberse, en parte, a una diferencia sexual en la velocidad de las reacciones de la ruta cetogénica que son comunes con el catabolismo de la leucina (Tomera y col. 1983).

Como durante la preñez se producen numerosas alteraciones fisiológicas mediadas por hormonas sexuales, cabe esperar que afecten a la utilización del MVA. Según Feingold y col. (1980a), así ocurre en las ratas: respecto a las no preñadas, hay un aumento de oxidación de MVA a los 12 días de embarazo y un descenso a los 18 días -coincidiendo con la época de máxima hipercolesterolemia-,

mientras que la incorporación en el conjunto del animal a esteroides es menor a los 12 días. Los citados autores creen demostrar con tales resultados una correlación inversa entre la actividad de la ruta cetogénica del MVA y la síntesis hepática de colesterol en el animal preñado, pero su aserto se nos antoja muy atrevido (carece de suficiente sostén).

(Sí que parece haber un descenso en el metabolismo del MVA por la ruta cetogénica asociado con un aumento en la síntesis hepática de esteroides a partir del MVA circulante en animales anémicos (Wiley y col. 1977a), diabéticos (Wiley y col. 1978, 1982) y urémicos (Feingold y col. 1983). La uremia induce cambios similares hasta cierto punto a los de la nefrectomía, ya que disminuye la oxidación de MVA a  $\text{CO}_2$  un 57% o un 34%, según aquélla sea aguda o crónica, respectivamente, al tiempo que la síntesis de lípidos insaponificables a partir del MVA circulante, sin alterarse en riñón, aumenta de dos a tres veces en hígado y en el conjunto del resto de órganos).

Otras hormonas que afectan al recambio del colesterol son las tiroideas. Estas estimulan la actividad HMG-CoA reductasa y la síntesis de colesterol, pero también su degradación. El efecto neto es un descenso de la colesterolemia en el hipertiroidismo y un aumento en el hipotiroidismo (Kritchevsky 1960, Ness y col. 1973). Pues bien, la administración de L-tiroxina a ratas incrementa la conversión renal de MVA circulante en colesterol un 41% en las hembras y un 22% en los machos (Feingold y col. 1980c). Cambios en sentido inverso induce el hipotiroidismo inducido con propil-2-tiouracilo. En cambio, la colesterogénesis del resto de órganos y la actividad cetogénica con MVA como precursor, no se afectan de forma significativa por acción de esas alteraciones hormonales (Fletcher y Myant 1958,

Feingold y col. 1980c).

Esto es, en resumidas cuentas, casi todo lo que se sabe sobre factores que alteren el metabolismo del MVA. Pero, ¿qué importancia pueden tener esos cambios para un organismo?.

#### Importancia cuantitativa del metabolismo del mevalonato

La formación y utilización del MVA, en la rata, se localiza así: la mayor parte del MVA circulante se produce en el hígado (Hagenfeld y Hellström 1972, Hellström y col. 1973); una pequeña fracción (menos del 5%) sale a la circulación y se metaboliza por la ruta de esteroides fundamentalmente en el riñón, pero también en el propio hígado (tras su reingreso), mientras que por la ruta cetogénica lo hace casi exclusivamente en el riñón.

El riñón tiene una actividad HMG-CoA reductasa y de incorporación de acetato a esteroides muy baja (Hellström y col. 1973), de manera que la mayor parte de su colesterogénesis la realiza a partir del MVA que, procedente del hígado, le llega por la sangre. Por consiguiente, de la magnitud de este aporte -y de la actividad renal, por supuesto- dependerá la importancia cuantitativa de la colesterogénesis renal y de sus cambios.

Entre los factores que pueden afectar a la esterologénesis renal destaca el posible papel de la ruta cetogénica. El efecto neto de ésta consiste en introducir HMG-CoA desde el citosol al interior de la mitocondria, aportando por tanto mayor cantidad de sustrato para la formación de cuerpos cetónicos, a base de sustraerlo del disponible para la síntesis de esteroides y otros compuestos. La posible función reguladora de la ruta cetogénica resulta evidente. Lamentablemente, no se han estudiado aún sus cambios de actividad en situaciones tales como las provocadas por un aporte exógeno de colesterol

o por el ayuno. En otras condiciones -como ya hemos visto- no siempre, ni mucho menos, se correlacionan inversamente los cambios de actividad esterologénica y cetogénica a partir de MVA, lo que no refrenda un papel regulador a modo de mera válvula de escape del exceso de MVA para la síntesis de colesterol de la ruta cetogénica. No obstante, esa posibilidad tampoco debe descartarse.

Sólo muy recientemente se han conseguido medir con cierta exactitud los niveles de MVA en plasma y orina, tanto en ratas como en humanos (Popják y col. 1979, Kopito y col. 1982). En las ratas, la concentración plasmática varía a lo largo del día entre unos 150 y 190 pmol/ml; el máximo corresponde al período oscuro, cuando la actividad reductasa es máxima, pero la variación no es estadísticamente significativa.

Sí produce un incremento fuerte (de cuatro a cinco veces) del nivel plasmático de MVA la nefrectomía bilateral (Kopito y Brunengraber 1980), que debe llevar consigo una mayor captación y utilización por los tejidos periféricos del MVA hasta compensar la liberación por parte del hígado -cuya actividad reductasa y velocidad de síntesis de esteroides no cambia, a pesar de que la administración "in vivo" de elevadas dosis de MVA sí las inhibe (Popják y col. 1979, Jett y Miller 1979, Edwards y col. 1979)-. Kopito y col. (1982) han calculado así mismo (por la diferencia de concentración arterio-venosa y por el aumento inicial de concentración plasmática tras la nefrectomía) la captación renal de MVA, que oscila (para ratas de unos 250 g) entre 500 y 600 pmol/min. La excreción de (R)MVA, contra lo que se creía inicialmente (Tavormina y col. 1956, Hellström y col. 1973), representa una fracción importante de la cantidad que llega a los riñones. Con riñones perfundidos, Brunengraber y col. (1981) han calculado que ;

independientemente de la concentración en el medio, la excreción urinaria representa 1/5 de la captación total de (R)MVA (los isómeros R y S se filtran de forma similar por el glomérulo, pero sólo se reabsorbe el enantiómero R), mientras que la incorporación a lípidos representa el 50% de la captación y el 63% del metabolismo del sustrato. Según un trabajo más reciente, de Kopito y col. (1984) la excreción urinaria de MVA representa aproximadamente un 13 y un 10% del captado por los riñones de ratas hembras y machos, respectivamente. La síntesis de esteroides da cuenta de alrededor del 50% del MVA captado, lo que, según nuestros cálculos, supondría del orden de un 0.2% de la síntesis total de colesterol en el cuerpo.

Según esos cálculos, la diferencia macho-hembra representaría aproximadamente un 0.05% de la última cantidad. En cuanto a la contribución de la ruta cetogénica, en las hembras evitaría la producción de un 0.04% del colesterol total sintetizado, según los datos de Kopito y col. (1984), o de un 0.1%, si hacemos caso a los datos más optimistas (Brady y col. 1983). En los machos, la mitad.

Los datos sobre humanos son más escasos. La concentración plasmática de MVA sigue un ritmo diurno inducido por la comida (no por un reloj biológico interno) con un máximo (50 pmol/ml) a las 7 a.m. y un mínimo (10 pmol/ml) a las 10 p.m. (Kopito y col. 1982), valores mucho menores que los encontrados en ratas. Se ha estimado (Kopito y Brunenbrager 1980) la excreción -que sigue el mismo ritmo diurno-, tanto de hombres como de mujeres, en 1.7  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ , lo que representa un 29% de la velocidad de filtración glomerular -frente a un 44% en la rata-. Durante el ayuno se incrementa la excreción de MVA. Puede tratarse de un mecanismo para "distraer" intermediarios de la ruta de esteroides, pero se cree más

probable que la causa sea una alteración de la reabsorción tubular renal (Kopito y col. 1982).

Todas estas estimaciones hacen pensar que la actividad renal sólo puede tener una incidencia en la colesterolemia a largo plazo. En este sentido se especula cuando se correlaciona el metabolismo renal del MVA con la conocida menor colesterolemia e incidencia de la aterosclerosis en las mujeres (Wiley y col. 1979). Por otra parte, se ha dicho que la aportación renal puede ser mayor en estados patológicos como los cancerosos. En estas situaciones, al perderse la retroinhibición sobre la HMG-CoA reductasa (Siperstein y Fagan 1964, Siperstein y col. 1966, Sabine y col. 1967), seguramente tiene lugar un notable incremento de los niveles de MVA circulante (Wiley y col. 1977a).

En opinión de algunos autores (Edmond y col. 1976), la hipercolesterolemia que acompaña a algunas enfermedades renales podría tener que ver con un mayor metabolismo del MVA circulante. Así, según Edgren y Hellström (1972), en la nefrosis inducida en ratas por aminoglucósido -asociada con hipercolesterolemia- hay una mayor utilización de MVA por el hígado.

Sin embargo estas evaluaciones sobre la importancia reguladora de la contribución renal y de la ruta cetogénica parecen prematuras. En primer lugar, no conocemos los cambios bajo diversas circunstancias en los niveles plasmáticos de MVA (por una mayor o menor exportación hepática) ni los cambios concomitantes de las actividades renales. Y en relación con los cambios de la concentración de MVA, se hacen imprescindibles estudios sobre la cinética de su metabolismo por una y otra ruta -concretamente, no se sabe nada acerca de la cinética de la ruta cetogénica-. En segundo lugar, care-

ce mos de información sobre los posibles cambios de actividad de la ruta cetogénica en el propio hígado que, no olvidemos, es el órgano que dispone de un mayor aporte de MVA (sintetizado "in situ"). Porque hay que puntualizar que las estimaciones "decepcionantes" sobre la importancia cuantitativa de la ruta cetogénica se refieren exclusivamente al MVA que ha pasado a la circulación (que Hellström y col. (1973) calcularon en un 5% del producido en hígado). Estas consideraciones se han olvidado hasta hace muy poco en la estimación de lo que la ruta cetogénica del MVA supone frente a la síntesis total de colesterol. En cambio, teniendo en cuenta el aporte local de sustrato, Weinstock y col. (1984) han estimado la actividad total de la ruta cetogénica en hígado de rata, resultando ser unas 200 veces superior a la renal. Según sus cálculos, esta ruta "atrapa" aproximadamente el 5% del MVA producido en hígado.

Creemos que se debe hacer otra consideración importante. En las evaluaciones de la importancia cuantitativa de la ruta cetogénica del MVA, se compara siempre su actividad con la de la ruta de esteroides. Hay un pertinaz olvido de las otras rutas alternativas que, recordemos, son minoritarias... en comparación con la colesterogénica, pero posiblemente no con la cetogénica. Pensamos que los cambios de actividad de esta última podrían ser fundamentales en la regulación de esas otras rutas, por ejemplo, controlando la disponibilidad de sustrato, en situaciones en que se modifican las actividades de la ruta de formación de colesterol.



## OBJETIVOS DEL TRABAJO



## OBJETIVOS DEL TRABAJO

A nuestro parecer -como ya hemos dicho-, la regulación del metabolismo del MVA se esclarecería estudiando cómo inciden en las actividades de las rutas esterologénica, cetogénica y otras, situaciones que alteran la velocidad de síntesis de colesterol y los niveles de éste, tales como la ingesta de colesterol, el ritmo diurno luz/oscuridad o el ayuno.

Como animales de experimentación nos parecieron especialmente apropiados los pollos recién nacidos, por tres razones fundamentales. La primera no es sino el relativamente extenso conocimiento de la colesteroogénesis de los pollos que se posee en nuestro laboratorio. A la hora de interpretar resultados será valiosísimo el caudal de datos procedentes de los estudios que se han llevado a cabo o que se están realizando, paralelos a los nuestros, sobre la actividad HMG-CoA reductasa, PPMVA descarboxilasa, incorporación de acetato, etc.

En segundo lugar, precisamente esos estudios previos han puesto de manifiesto cambios aparatosos de la actividad reductasa y de la incorporación de acetato en el hígado tras la eclosión del pollo, probablemente derivados del cambio brusco de aporte nutritivo -similar hasta cierto punto al que conlleva el destete de los mamíferos-. Tales dramáticas alteraciones hacen de pollo durante este período un modelo interesantísimo por la posibilidad de observar, magnificadas (y, por tanto, menos equívocas), las variaciones fisiológicas de actividades como respuesta a los cambios en el suministro nutritivo.

En los últimos años se ha encontrado que hay diferencias entre las aves y la mayoría de los mamíferos en cuanto al control hormonal del metabolismo -incluyendo el lipídico-, a la actividad relativa de diversas rutas y a los tejidos de mayor importancia cuantitativa en la síntesis lipídica (siendo en este aspecto el pollo más parecido al hombre que la rata, por cuanto que en ambos predomina el hígado). No obstante, cualitativamente, las grandes rutas metabólicas son similares en aves y mamíferos. Y, en lo que se refiere al control de la biosíntesis de colesterol, tanto en unos como en otros se ejerce fundamentalmente modulando la actividad HMG-CoA reductasa. Por otra parte los pollos, como los humanos, son muy susceptibles al aporte exógeno de colesterol y, al contrario que las ratas (los animales de experimentación más empleados en los estudios acerca de la colesterologénesis), desarrollan fácilmente hipercolesterolemia y aterosclerosis (Chandler y col. 1979).

Con todas las consideraciones expuestas en mente, elaboramos el siguiente plan de trabajo:

- Puesta a punto de la metodología.
- Estudios cinéticos.
- Estudio del control del metabolismo del MVA por la ruta de esteroides y por la ruta cetogénica a lo largo del desarrollo postnatal del pollo.
  - Estudio de los niveles de colesterol.
  - Estudios del metabolismo del MVA por la ruta de esteroides "in vitro".
  - Estudios sobre el metabolismo del MVA por la ruta de esteroides "in vivo".

- Cambios en la actividad de la ruta cetogénica del MVA tras la eclosión: efecto de la ingesta de colesterol.
- Suministro neonatal de colesterol como factor antihipercolesterolemico.
- Variaciones diurnas en el metabolismo del MVA.
- Efecto del ayuno en el metabolismo del MVA.



PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES





## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### I. MATERIAL.

#### 1. Material biológico.

Se han utilizado pollos machos de la raza Leghorn blanca (Gallus domesticus), suministrados por una granja comercial (Avigrana, S. A.) en el momento de su nacimiento.

Los pollos se acomodaban en jaulas acondicionadas para que tuvieran un adecuado acceso al agua y a la comida. Las jaulas se dispusieron en una habitación con renovación de aire, temperatura entre 28 y 30°C y luz de tubos fluorescentes desde las 9.00 h hasta las 21.00 h.

Los animales fueron alimentados con una dieta estándar, especialmente indicada para pollos de arranque, marca Sanders, tipo A00, cuya composición centesimal era la siguiente:

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

---

Total 100

En determinados casos, la dieta fue suplementada con colesterol al 2% o al 5% en peso. Las dietas así preparadas fueron mezcladas concienzudamente hasta presentar un aspecto homogéneo, y suministradas a los animales "ad libitum".

2. Aparatos e instrumentación.

Balanza Sartorius (Pmax. = 160 g, d= 0.1 g).

Balanza Mettler H 20T (Pmax. = 160 g, d= 0.01 mg).

Microtomo manual C. A. Thomas Co, Filadelfia (USA)

y cuchillas de acero nº 7, 120 D.

Incubadores metabólicos Gallenkamp IH-350, provistos de un sistema de agitación.

Micropipetas "Emil Works" de enrase automático por estrangulamiento.

Micropipetas automáticas "Finnpipette".

Vibradores Whirlimixer y Heidolph.

Agitadores S/Invester.

pHmetro Radiometer pH M 84 ( $\text{pH} \pm 0.001$ ).

Homogenizador Potter mecánico (MSE) provisto de un pistilo recubierto de teflón y tubo de vidrio.

Centrifugas de mesa Piccolo (Martin Christ).

Microfuga Beckman, tipo B.

Centrifuga refrigerada de alta velocidad Beckman J-21B.

Ultracentrifuga preparativa Beckman L3-50.

Fotocolorímetro Bausch-Lomb, Spectronic 20.

Contador de centelleo Philips, PW 4510.

Contador de centelleo Beckman LS-7500.

Rotavapor "R" de Buchi.

Microordenador EAKA, Video Genie System, EG 3003.

Sonicador Sonifier B-12 de Branson Sonic Power Company (Conneticut).

3. Reactivos.

El (R, S)-(2-<sup>14</sup>C)MVA, (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA (ambos en forma de lactona) y el (7(n)-<sup>3</sup>H)colesterol fueron suministrados por "Radiochemical Centre", Amersham, U.K. La lactona racémica del MVA no marcado era de Sigma.

La sal potásica del MVA se preparó tratando la lactona con un ligero exceso de KOH (de manera que el pH resultante fuese inferior a 8) durante 30 min a 37°C. El MVA marcado y el no marcado se mezclaron en las proporciones adecuadas para conseguir la actividad específica requerida.

El resto de los productos utilizados eran de grado analítico, suministrados por firmas acreditadas (Merck, Carlo Erba, etc.).

## II. METODOS.

### 1. Metabolismo "in vivo" del mevalonato.

#### 1.1. Administración del mevalonato.

La cantidad adecuada de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA, disuelta en 0.3 ml de una solución de NaCl al 0.9%, era administrada por inyección intraperitoneal a las 9.00 h -salvo otra indicación-. Cada pollo inyectado era inmediatamente metido en un matraz reactor cilíndrico de 2 l de capacidad con una camisa (el matraz) por la que circulaba agua para mantener una temperatura en el interior de 28°C, y una tapa con orificios de boca esmerilada para la entrada y salida del aire. La circulación de éste a velocidad constante se conseguía mediante una trompa de agua. A la salida del aire se conectaron en serie dos frascos lavadores con 200 ml de NaOH 3 N, para la captación del CO<sub>2</sub> espirado por el pollo. El aire que entraba también se hacía pasar por una solución de NaOH 1N para privarlo del CO<sub>2</sub>, y por CaCl<sub>2</sub> para quitarle la excesiva humedad. Mediante un manómetro comprobamos que el sistema de circulación de aire provocaba un descenso de presión en el interior de la cámara de sólo 2 mm de mercurio respecto a la presión atmosférica.

Transcurrido el tiempo indicado en cada caso, se mataban los pollos por decapitación.

#### 1.2. Medida del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

De cada uno de los frascos lavadores se tomaban dos alícuotas, de 0.2 y 0.4 ml, y se añadían a un vial con 2 ml de etanol absoluto. A continuación se añadían 8 ml de líquido

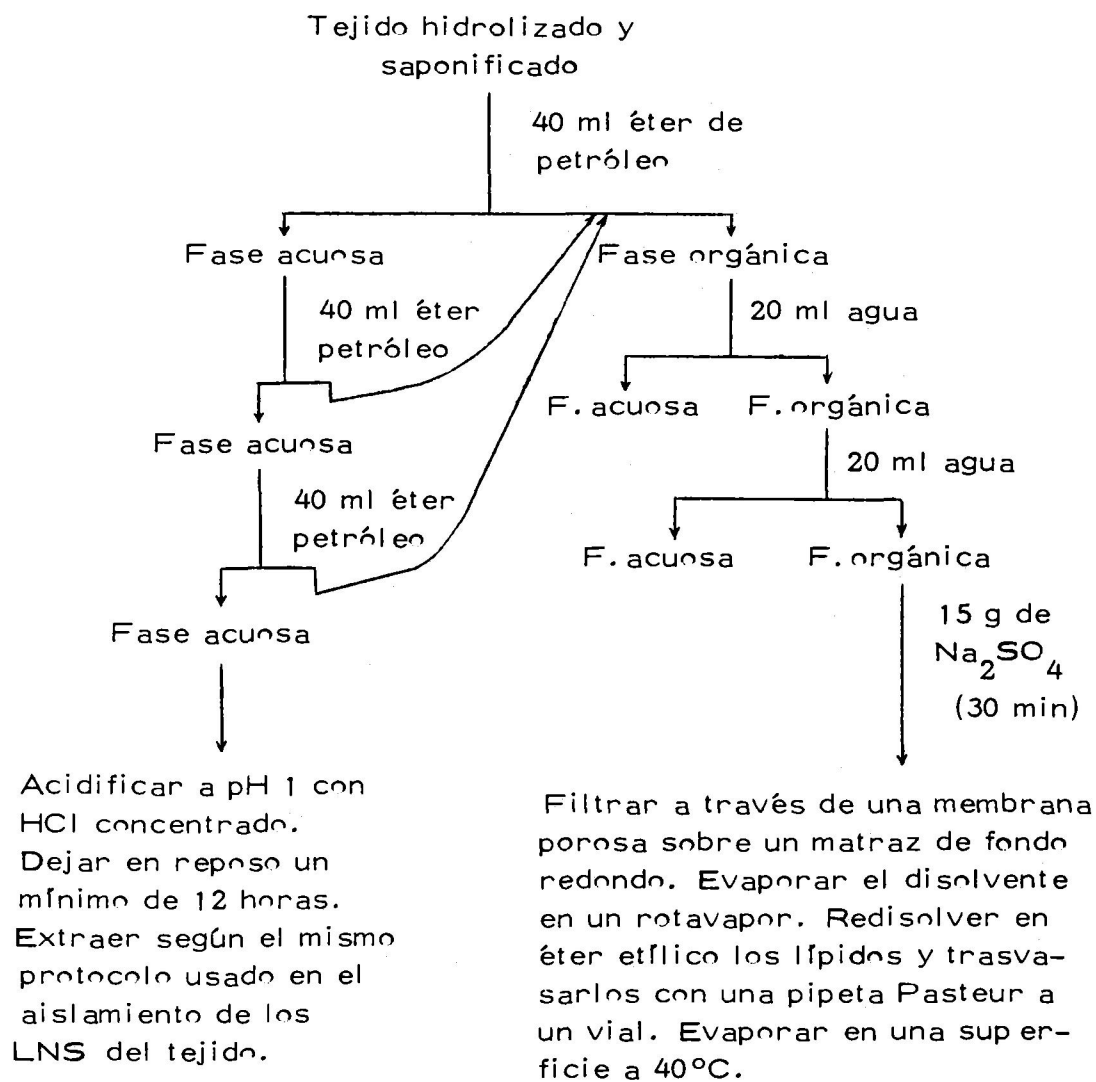
de centelleo con esta composición: 2 g PPO, 0.02 g dimetil-POPOP, 500 ml tolueno, 300 ml etanol. Esta forma de adición de la muestra permite una mejor solubilización.

Las d.p.m. del vial se midieron en el contador de centelleo líquido utilizando un programa que previamente construimos tras hacer una curva de calibración empleando soluciones de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $\text{NaOH}$  3N como agentes productores de extinción ("quenching").

### 1. 3. Extracción y medida de los lípidos insaponificables y de los lípidos saponificables marcados.

Después de matar al pollo, los órganos que nos interesaban eran rápidamente extraídos, cortados en trocitos y colocados en matraces Erlenmeyer, a los que se añadía  $\text{KOH}$  90% (2 ml/g de tejido) y 5 vol. de etanol 70%. Los matraces, a los que añadía un estándar interno de ( $^3\text{H}$ )colesterol (en cantidad tal que las c.p.m. de  $^3\text{H}$  fueran 5-10 veces mayores que las c.p.m. de  $^{14}\text{C}$  en los insaponificables), se colocaban en una superficie a 60-70°C durante al menos 4 h para llevar a efecto la saponificación (además de la total hidrólisis y homogenización del tejido). La extracción de los lípidos insaponificables y de los saponificables se efectuó según el esquema 3.

Para medir la radiactividad en el conjunto de los insaponificables o de los saponificables, los lípidos del vial correspondiente se redisolvan en 2 ml de cloroformo, de los que se tomaban alícuotas de 0.1 y 0.2 ml que se disponían en otro vial. Tras la evaporación total del cloroformo -un fuerte agente pro-



Esquema 3. Procedimiento de extracción de los lípidos saponificables y de los lípidos saponificables de los tejidos.

ductor de extinción-, se añadían 10 ml de un líquido de centelleo con esta composición: 934 ml de tolueno, 66 ml de acetato de etilo, 5 g de PPO y 0.3 g de POPOP. Después de agitar 10 segundos, los viales se medían en el contador de centelleo con un programa de doble marcado (la curva de calibrado se hizo en este caso utilizando un extracto de lípidos insaponificables de hígado y riñón como agente productor de extinción).

#### 1.4. Fraccionamiento de los lípidos insaponificables.

La separación de diferentes fracciones de los lípidos insaponificables se efectuó mediante cromatografía en capa fina, según el sistema descrito por Raskin y Siperstein (1974). Alícuotas de 100 o 200  $\mu$ l se disponían con micropipetas de enrase por estrangulamiento a 2 cm del extremo de placas activadas (2 h a 120°C) de sílica-gel de 0.5 mm de espesor. Las placas se desarrollaban hasta 3/4 de su longitud en acetato de etilo/benceno (1:5), se secaban bajo corriente de aire caliente durante 1 h y se volvían a desarrollar en heptano/benceno (97:3).

Después de secarlas bien, las placas se revelan en una campana de yodo sublimado. Los distintos lípidos insaponificables se localizaron mediante la utilización de patrones de colesterol, lanosterol, escualeno y ubiquinona-10. Las placas se dejaban durante 1 h bajo una corriente de aire frío para la completa eliminación del yodo adsorbido a los dobles enlaces, y a continuación se raspaban las distintas zonas sobre viales a los que se añadía el líquido de centelleo para lípidos.

Los Rf de las zonas de las placas que fueron raspadas y medidas son los siguientes:

<u>Compuestos que migran como</u>	<u>Rf</u>
Escualeno	0.79
Ubiquinona-10	0.63
Lanosterol	0.38
Colesterol	0.27
Lípidos insaponificables polares (LNSP)	0-0.22

En la amplia zona de las placas entre lanosterol y ubiquinona-10 suelen aparecer bandas que se colorean con el iodo, pero siempre estuvieron carentes de radioactividad detectable.



## 2. Metabolismo "in vitro" del mevalonato.

### 2.1. Incubación.

Los pollos se mataban entre las 8.00 y las 9.00 h. por decapitación, e hígados y riñones se extraían rápidamente y se colocaban en una mezcla salina que se prepara mezclando las siguientes disoluciones:

120 ml de NaCl 18‰  
96 ml de KCl 1.15‰  
18.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M  
24 ml de  $\text{MgSO}_4$  3.82‰  
72 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.11 M  
72 ml de  $\text{NaHCO}_3$  1.3‰  
2280 ml de agua

Las condiciones de incubación se basaron en el método de Righetti y col. (1976). Se preparaban cortes de tejido de 0.2 mm de espesor con un microtomo Thomas. La cantidad adecuada de tejido -especificada en cada caso- se disponía en la periferia de matraces cónicos de 25 ml de capacidad y con un pocillo central de 1 ml. Los matraces contenían tampón Krebs-Ringer bicarbonato (pH 7.4) (que se prepara gaseando la mezcla salina 10 minutos con  $\text{CO}_2$ , añadiéndoles 0.2 vol. de  $\text{NaHCO}_3$  1.3‰ y volviendo a gasear con  $\text{CO}_2$  otros 10 minutos) en cantidad adecuada para alcanzar tras la adición del sustrato un volumen final de 2 ml.

El MVA marcado (normalmente, 0.1 ml) se añadía y el matraz se gaseaba durante 30 segundos con una corriente de carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), tras lo cual se cerraba herméticamente con una rodaja de goma sujeta con un tapón de rosca. Las incubaciones se realizaron a 37°C en incubadores metabólicos que oscilaban 104 veces por minuto.

Al final del período de incubación -especificado en cada caso-, se inyectaba con una jeringa 0.4 ml de NaOH 3N en el pocillo central y 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N en su periferia. El bicarbonato marcado, tras la acidificación, pasaba a la atmósfera del matraz como CO<sub>2</sub> y era recogido de nuevo como sal en el pocillo durante los 30 minutos de reincubación del matraz en el incubador metabólico a 72 oscilaciones/min y a 37°C.

## 2. 2. Medida del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

Después de la reincubación, se abrían los matraces y se añadían 0.1 y 0.2 ml de la solución de los pocillos a sendos viales con 10 ml de líquido de centelleo de esta composición: 2 g PPO, 0.02 g POPOP, 500 ml metanol, 500 ml tolueno. Previamente comprobamos, utilizando NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> como estándar, que la recuperación de la radiactividad en la solución del pocillo era superior al 95%. Los viales fueron medidos en el contador de centelleo con el programa correspondiente, construido tras realizar la curva de calibración adecuada.

## 2. 3. Medida de los lípidos insaponificables y saponificables marcados.

Una vez añadido el estándar interno de (<sup>3</sup>H)colesterol, el contenido del matraz -fuera del pocillo- se transfería a un

matraz Erlenmeyer con KOH 90% (2 ml/g tejido) y 5 vol. de etanol del 70%. La saponificación y la extracción de los lípidos insaponificables y saponificables -en su caso- se hicieron siguiendo el mismo procedimiento de los experimentos "in vivo".

### 3. Incorporación "in vitro" de lípidos insaponificables.

En algunos experimentos, tras la inyección del (5-<sup>14</sup>C)MVA a los pollos, el posterior aislamiento de los lípidos insaponificables y su cromatografía en capa fina, hicimos una extracción de las distintas fracciones localizadas en las placas (lípidos insaponificables polares, colesterol, lanosterol, compuestos que migran con la ubiquinona y escualeno) con 30 ml de cada uno de los siguientes disolventes: etanol, éter etílico, cloroformo y acetona. A continuación evaporamos los disolventes hasta quedarnos con los lípidos secos.

Para el estudio del destino metabólico de los lípidos extraídos, seguimos el método de Johnson y Shah (1974). Redisolvimos cada fracción lipídica en etanol del 96% (en la proporción de 1 ml para los lípidos procedentes de cada 15 g de tejido), y pusimos 0.1 ml de esta solución en un matraz de 25 ml de capacidad. Añadimos 0.4 ml de albúmina al 5% y agitamos 10 seg en un vibrador. Adicionamos 3.5 ml de tampón fosfato 0.1N, pH= 7.4, que llevaban disueltos 7.5 g de NADP, 28 mg de glucosa-6-fosfato y 50 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La incubación se iniciaba inmediatamente, al poner en el matraz 1 ml de homogenado de hígado (5 g/10 ml tampón fosfato 0.1N, pH 7.4). Tras 5 h de reacción en atmósfera de carbón-dioóxido, la paramos con KOH 90% (1 ml) y etanol del 70% (5 ml). Dejamos transcurrir la saponificación 4 h a 70°C, extrajimos los lípidos insaponificables y procedimos a una nueva separación de los mismos por cromatografía en capa fina según el método de Raskin y Siperstein. La radiactividad de cada fracción se midió por el procedimiento ya descrito.

#### 4. Precipitación con digitonina.

La digitonina provoca la precipitación selectiva de determinados  $3\beta$ -hidroxiesteroides. Para llevar a cabo la precipitación se prepara una solución de 5 g de digitonina en 1 l de etanol del 95%. A 1 ml de solución etanólica de esteroides se le adiciona 1 ml de la solución de digitonina. A los 10 min se centrifuga durante 10 min a  $3000\times g$ , tras lo cual se puede decantar el sobrenadante cuidadosamente.

5. Determinación de los niveles de colesterol.

5.1. En hígado, riñones y encéfalo.

5.1.1. Extracción de los lípidos.

Los lípidos fueron extraídos del órgano correspondiente siguiendo el método de Santiago y col. (1968). Se deposita el trozo de órgano que se quiere analizar, previamente triturado, en un Potter manual junto con 2 ml de mezcla cloroformo: metanol: clorhídrico 35% (200: 100: 1) y se homogeniza durante 5 min. El homogenado resultante se vierte a un tubo de boca esmerilada al que se añaden 3 ml de HCl 0.1N y se agita vigorosamente durante 1 min.

Tras una centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 min aparecen tres fases. La fase superior (acuosa) se elimina mediante una pipeta Pasteur adaptada a una perilla de goma. La fase clorofórmica inferior se recoge en otro tubo decantando cuidadosamente. Con la fase intermedia (proteica) se realiza una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento. La fase orgánica resultante de esta extracción se reúne con la primera y se evapora bajo corriente de nitrógeno.

El extracto lipídico se redisuelve en 1 ml de cloroformo, del que se toman alícuotas para la determinación de colesterol total, libre y esterificado.

### 5. 1. 2. Determinación de colesterol total.

Para la determinación de colesterol total se siguió la técnica de Carr y Dreckker (1962) y la de Martenson (1963). Se trata de una técnica colorimétrica basada en la reacción de Lieberman-Burchard, en la que el colesterol sufre una deshidratación, condensación e isomerización en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico, dando lugar a la aparición de compuestos coloreados con un máximo de absorción a 620 nm.

Del extracto lipídico correspondiente se toman dos alícuotas de 25 y 50  $\mu$ l y se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Asimismo de una solución patrón de colesterol en cloroformo (1 mg/ml) se toman 25, 50, 75 y 100  $\mu$ l y se deja evaporar el disolvente.

Una vez secos los tubos problemas y los patrones, se les agrega 100  $\mu$ l de cloroformo y se agita suavemente hasta conseguir la total disolución de los lípidos. A continuación se añade a cada tubo 3 ml de una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico (10:1) recién preparada (esta mezcla debe ser totalmente transparente).

Tras agitar los tubos en un vibrador, se disponen en un baño de agua a 25°C durante 10 min, al cabo de los cuales se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm.

### 5. 1. 3. Determinación de colesterol libre y esterificado.

La separación del colesterol libre de sus ésteres se realizó por cromatografía en capa fina siguiendo la técnica de Corominas y Permanyer (1972).

En un extensor Shandan Unoplan se disponen placas de vidrio de 20x20 cm previamente desengrasadas con acetona. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se mezclan 50 g de silicagel G (tipo 60) con 100 ml de agua y se agita vigorosamente durante 1.5 min. Inmediatamente se vierte la mezcla sobre un extensor adaptado para obtener un espesor de capa de 0.5 mm, y se extiende el silicagel de manera uniforme por toda la superficie de las placas. Estas, tras consolidarse la película de silicagel a temperatura ambiente, se colocan en una gradilla y se activan en una estufa a 120°C durante dos horas como mínimo. Las placas se pueden guardar activadas en una atmósfera desecante mantenida con  $\text{CaCl}_2$ .

A 2 cm de un borde de la placa activada se disponen 100 o 200  $\mu\text{l}$  de la solución clorofórmica de la muestra. El desarrollo se lleva a cabo en cubetas de vidrio donde, al menos 6 h antes se habían echado 100 ml de la mezcla cloroformo: benceno (6:4). Cuando el líquido de desarrollo alcanza el frente, situado a 15 cm del origen, se retira la placa, se seca con secador y se revela con vapores de yodo. El yodo se fija a los dobles enlaces y aparecen manchas de color amarillento. Después de marcarlas, se elimina el yodo poniendo las placas durante 1 h bajo una corriente de aire frío. De esta forma se separan los siguientes compuestos:



<u>Compuestos</u>	<u>Rf</u>
Esteres de colesterol	0.70
Triglicéridos	0.53
Colesterol libre	0.15
Acidos grasos	0.05
Fosfolpidos	0.00

Las zonas correspondientes a colesterol libre y a colesterol esterificado se raspan y depositan en tubos de centrifuga. A cada uno de ellos se le añaden 3 ml de una mezcla etanol: acetona: éter etílico (1: 1: 1), se agita durante 15 s y se centrifuga durante 15 min a 1000 x g. El sobrenadante se decanta a otro tubo y con el precipitado se realiza una segunda extracción de igual forma. Los sobrenadantes se reúnen y se secan bajo corriente de nitrógeno. El colesterol se determina por el procedimiento ya descrito.

Con los datos obtenidos se calculan los porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado. Aplicando estos porcentajes al contenido de colesterol total hallado anteriormente, se calculan los mg de colesterol libre y esterificado en el órgano completo y por cada 100 mg de tejido fresco.

El error estándar de la media (SEM) de estos datos se calculó según la expresión siguiente:

$$SEM = \sqrt{T^2 \cdot SEM_P^2 + P^2 \cdot SEM_T^2}$$

Siendo:

T = contenido de colesterol total.

$SEM_T$  = error estándar de la media del contenido de colesterol total.

P = fracción de colesterol libre o esterificado.

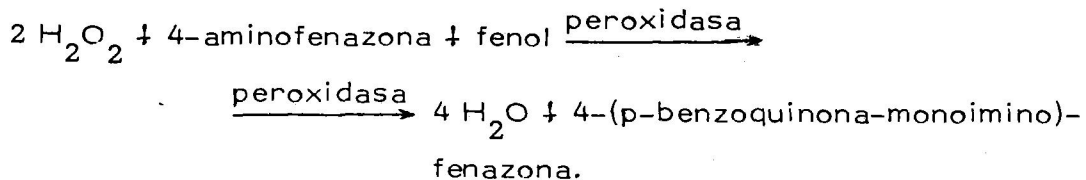
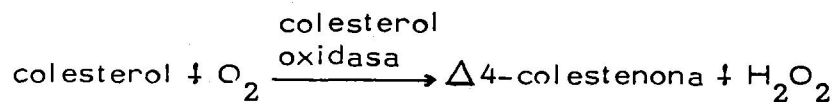
$SEM_P$  = error estándar de la media de la fracción de colesterol libre o esterificado.

## 5.2. En plasma.

### 5.2.1. En plasma completo.

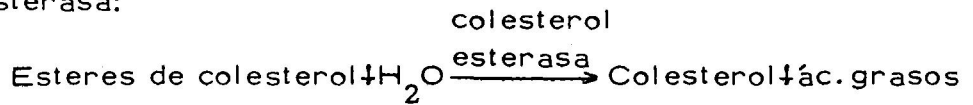
Después de anestesiar al pollo con éter etílico, se le extrae la sangre de la arteria femoral, se dispone en tubos de microfuga de 1.8 ml de capacidad (a los que previamente se ha añadido 1.8 mg de EDTA) y se centrifuga durante 4 min a  $3000 \times g$ , tras lo cual se decanta el plasma.

Para determinar el contenido total de colesterol del plasma empleamos un "kit" de la marca Spinreact, que utiliza un método basado en las actividades colesterol oxidasa y peroxidasa:



Este último compuesto es un cromógeno con un máximo de absorción entre 500 y 550 nm.

De esta forma es posible medir todo el colesterol libre. Para medir también el esterificado hay que añadir colesterol esterasa:



#### Técnica.

Se disuelve suavemente la colesterol oxidasa y la peroxidasa en una solución 3.5 mM de 4-aminofenazona de forma que haya 0.5 U/ml y 5.25 U/ml de una y otra enzima, respectivamente. Cada ml de esta solución enzimática se mezcla con 1 ml de una solución tamponada (pH 7.45) de fenol (26.5 mM de fenol, 8 mM de fosfato) y 10 ml de agua. Esta mezcla se utiliza para determinar el colesterol libre. Para medir el colesterol total, se añaden 0.15 ml de una suspensión estabilizada de colesterol esterasa que tiene 0.16 U/ml.

Para la colorimetría, se mezclan con suavidad -por inversión- 20 µl de muestra con 2 ml de reactivo, se incuba a 37°C durante 15 min y se lee a 520 nm frente a un blanco constituido por la mezcla reactiva exclusivamente. La recta patrón se prepara con colesterol disuelto en isopropanol.

#### 5.2.2. En las HDL y en VLDL+IDL+LDL.

Para la rápida separación de ambos grupos de lipoproteínas plasmáticas, seguimos el procedimiento recomendado por Warnick y Albers (1978) de precipitación con heparina y manganeso. A 1 ml de plasma se le añaden 0.04 ml de heparina sódica (35.2 mg/ml) y 0.05 ml de MnCl<sub>2</sub> (2 M), lo que origina una concen-

tración final de 1.3 mg/ml de heparina, y 0.092 M de  $\text{MnCl}_2$ . Se incuba 10-30 minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga en la microfuga a  $1500 \times g$  durante 30 minutos. El análisis de ambas fracciones por electroforesis en gel de poliacrilamida (utilizando un "kit" de la marca Boehringer) revela una contaminación cruzada inferior al 7%.

El colesterol de las HDL (sobrenadante) se mide por el mismo método que el empleado para el plasma completo. El colesterol del resto de las lipoproteínas se calcula sustrayendo el contenido en las HDL del colesterol plasmático total.

6. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa en hepatocitos.

6.1. Obtención de los hepatocitos.

Dadas las dificultades técnicas de la perfusión hepática en los pollos, especialmente cuando son pequeños, decidimos, para obtener hepatocitos, seguir el método descrito por Bashor (1979).

El hígado se tritura y se incuba en un matraz Erlenmeyer con 10 vol. (en relación al peso del tejido) de colagenasa (0.2 mg/ml de mezcla salina) (Seglen 1973) durante 20 min. La separación de las células liberadas de los fragmentos no digeridos se efectúa filtrando a través de gasas finas superpuestas con las mallas entrecruzadas. Las células filtradas se transfieren a tubos de centrifuga y se precipitan por centrifugación durante 5 min a 100 x g. Las células se resuspenden en mezcla salina y se repite la centrifugación. Tras eliminar el sobrenadante, se pesan los hepatocitos y se resuspenden en 3 vol. de medio esencial mínimo (MEM) de Eagle (1959).

La medida de la viabilidad de las células se hace mediante la prueba de integridad de las membranas celulares con azul Tripan (Tennant 1964, Hanks y Wallace 1958). A los 5 min de tinción, no llegó nunca al 5% la proporción de células teñidas -no viables-.

## 6. 2. Incubación de los hepatocitos con lípidos insaponificables polares.

Para incubar los hepatocitos con los LNSP (extraídos como ya se ha explicado), seguimos básicamente la técnica de Gibbons y col. (1980). Los LNSP se disuelven en etanol en la relación 50 mg/1 ml. A 0.1 ml de esta disolución, colocados en un matraz de 20 ml, se añaden 0.4 ml de albúmina sérica bovina (de Sigma) al 5% (peso/volumen) disuelta en MEM. La mezcla se agita durante 10 s en un vibrador. Otros matraces, controles, contenían los mismos compuestos salvo los lípidos.

A cada matraz se añade una cantidad de hepatocitos suspendidos en MEM de forma que se mantenga la relación entre el peso de los LNSP extraídos de un hígado y el peso de éste. Los matraces se incuban durante 1 h a 37°C en un incubador metabólico con agitación (60 oscilaciones/min) y bajo atmósfera de carbógeno.

Al final de la incubación, una fracción de los hepatocitos se incubó con (1-<sup>14</sup>)acetato, otra con (5-<sup>14</sup>C)MVA (por el procedimiento ya relatado) y una tercera se dispuso para la cuantificación de la actividad HMG-CoA reductasa.

## 6. 3. Extracción de microsomas de los hepatocitos.

La parte de la suspensión de hepatocitos destinada a la medida de la actividad reductasa se centrifugó durante 10 min a 1000 x g. El precipitado se resuspendió (0.6 ml/g) en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.8, que llevaba EDTA (92.29 mg/100 ml), sacarosa (8.56 g/100 ml) y DTT (15.22 mg/100 ml).

La suspensión de hepatocitos se homogenizó por sonicación (Lieberman y Gingold 1962) en el sonicador Sonifier B-12 durante 10 períodos de 30 s con una intensidad de 70 vatios y dejando entre cada dos períodos un intervalo de otros 30 s. Durante todo el proceso, el tubo con la muestra estaba sumergido en hielo picado.

La extracción de los microsomas del homogenado se hizo según el procedimiento descrito por Dugan y col. (1972). El homogenado se centrifuga a  $15000 \times g$  durante 15 min, a  $4^{\circ}C$ . El sobrenadante se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. El nuevo sobrenadante se centrifuga a  $105000 \times g$  durante 90 min (y a  $4^{\circ}C$ ). El sedimento, con los microsomas, se resuspendió en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.4, que contenía como protectores EDTA (30 mM),  $MgCl_2$  (250 mM) y DTT (1mM) (Alejandre y col. 1981). El volumen final de la suspensión se calculaba para que tuviera aproximadamente 2-4 mg de proteínas por ml. La concentración proteica exacta de las suspensiones microsomales se determinó mediante el método de Lowry y col. (1951) utilizando como patrón albúmina bovina.

#### 6.4. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa.

Hemos seguido el método de Shapiro y col. (1974) modificado por Alejandre y col. (1981). Se añaden 100  $\mu$ l de la suspensión microsomal a tubos de polietileno de 0.4 ml de capacidad, provistos de tapón, y se preincuban a  $37^{\circ}C$  durante 5 min.

La reacción se inicia por adición de 25  $\mu$ l de ( $^{14}\text{C}$ )HMG-CoA (50 nmol y aproximadamente 0.05  $\mu$ Ci) y de 4.5  $\mu$ mol de glucosa-6-fosfato, 0.3 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de 450 nmol de NADP -sistema regenerante de NADPH- en 25  $\mu$ l de tampón con protectores. Los tubos cerrados y bien agitados, se incuban durante 30 min a 37°C.

La reacción se para con 25  $\mu$ l de HCl 10 N, al tiempo que se añade una cantidad adecuada de ( $^3\text{H}$ )mevalonolactona -de manera que las c.p.m. de  $^3\text{H}$  resulten 5-10 veces superiores a las del  $^{14}\text{C}$  del MVA formado por acción de la reductasa-. Hecho esto, se dejan los tubos 30 min a 37°C para que se produzca la lactonización del MVA sintetizado.

Tras centrifugar los tubos 1 min a 10000  $\times$  g para sedimentar las proteínas, se aplican 100  $\mu$ l de cada tubo a placas activadas de silicagel G (tipo 60) y se desarrollan en benceno:acetona (1:1). La zona de placa con la mevalonolactona ( $R_f$  entre 0.38 y 0.7) se raspa sobre viales con 10 ml de este líquido de centelleo: 7 g PPO, 0.3 g POPOP, 100 g naftaleno, 1 l dioxano. Se agita 15 s en un vibrador y se mide en el contador de centelleo con el programa adecuado.



## 7. Tratamiento de los datos.

Los datos experimentales se expresan generalmente como la media de los valores obtenidos de distintos animales,  $\bar{x}$  el error estándar de la media.

Para comparar valores de dos tratamientos, 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 (1956). Según el caso, se aplicó el test correspondiente de la *t* de Student (1907), calculándose mediante un programa de ordenador el valor, hasta la tercera cifra significativa, de la probabilidad (*p*) de que ambas muestras pertenezcan a la misma población.

El ajuste de rectas de regresión se realizó por el procedimiento convencional, según el método de mínimos cuadrados. Para ajustar una hipérbola o una sigmoide por mínimos cuadrados a los datos de los experimentos en los que se variaba la concentración de MVA, se construyó un programa de ordenador que encontraba los parámetros de las ecuaciones correspondientes mediante aproximaciones sucesivas (hasta los límites impuestos por la precisión del ordenador) a los mejores valores.

En la preparación de tablas y figuras, así como en la nomenclatura de compuestos y en la utilización de unidades, hemos seguido normalmente las recomendaciones de diversos organismos científicos internacionales, recopiladas en: "Instructions to authors" (J. Biol. Chem. 260, 1-11 (1985)).

Cuando se utilizó (2-<sup>14</sup>C)MVA como sustrato, el cálculo del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberado por la ruta cetogénica se realizó tal como describen Righetti y col. (1976). Como por cada 5 átomos de C marcados del MVA que se incorporan a la molécula del colesterol, 1 se pierde -en la desmetilación del lanosterol- como <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, hay que descontar 1/5 de la radiactividad incorporada a colesterol del total de la encontrada en el CO<sub>2</sub>, para que esta medida corresponda exclusivamente al <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formado por el desvfo cetogénico. Ese mismo valor se suma a la radiactividad del colesterol. Cuando se empleó (5-<sup>14</sup>C)MVA, no se pierde ningún átomo de carbono marcado como <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por la ruta coleslerogénica.

## RESULTADOS Y DISCUSION



## RESULTADOS Y DISCUSION

### I. PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS. ESTUDIOS CINETICOS.

El primer paso para el estudio de la biosíntesis de colesterol y de la cetogénesis a partir del MVA consistió en la adquisición de la metodología adecuada. Por tal entendimos la que nos permitiera conocer la participación de cada órgano en el metabolismo del MVA circulante y la existencia o no de puntos secundarios de regulación sensibles al control por retroinhibición.

Estas exigencias no se satisfacen totalmente con los métodos actuales de estudio "in vivo" por la dificultad que representa la movilidad del colesterol y de algunos de los intermediarios de su biosíntesis, que hace imposible decidir si el colesterol que aparece en un órgano tras la administración de un precursor marcado se ha sintetizado totalmente en el propio órgano. Las limitaciones para el estudio de la ruta cetogénica del MVA son, en este sentido, aún mayores.

Si atendemos a los métodos de estudio "in vitro" los inconvenientes son de otro tipo. Se plantea la cuestión, fundamental, de la validez de las extrapolaciones de los resultados obtenidos en estos experimentos al animal íntegro. No hay que olvidar nunca que un animal es un sistema abierto, y las graves perturbaciones que podemos introducir cuando aislamos una parte del sistema (esto es, un subsistema), puesto que sus relaciones con los restantes subsistemas o con su medio exterior se interrumpen. Este inconveniente se agudiza cuando las sustancias que se estudian son móviles, como es nuestro caso. La dinámica de las moléculas móviles, sobre todo de las de origen mixto -endógeno y exógeno- puede ser mucho más compleja que la de las moléculas fijas, y así se concibe que la mera aproximación bio-

química "in vitro" no contribuya más que parcialmente al conocimiento de un sistema tipo colesterol.

Por estos motivos, nos pareció lo más adecuado el empleo simultáneo -para un estudio determinado- de ambos tipos de métodos. Las primeras experiencias se realizaron con objeto de fijar las condiciones óptimas para su utilización y de conocer la cinética del metabolismo del MVA por la ruta de esteroides y por la cetogénica. Hemos estudiado la actividad de la ruta conducente a esteroides mediante el aislamiento de los lípidos insaponificables totales y la separación de algunos de ellos. Esto último podría sernos útil para localizar con mayor precisión la posible existencia de alguna etapa reguladora. Por otra parte, hemos medido en algunos casos la radiactividad incorporada a la fracción saponificable -que incluye los ácidos grasos- y el  $^{14}\text{CO}_2$  formado, como índices de la actividad de la ruta cetogénica (incluyendo, en el primer caso, el metabolismo del acetil-CoA a ácidos grasos).

#### 1. Puesta a punto del método de estudio "in vivo" de la incorporación del mevalonato.

Las experiencias que se describen en este apartado pretendían el conocimiento de la cinética del metabolismo del MVA y el establecimiento de la dosis de sustrato y el tiempo óptimos para los posteriores estudios, sobre todo en hígado y riñón -descritos en rata como los órganos más activos en el metabolismo del MVA circulante por la ruta de esteroides- y en cerebro, piel y médula espinal -donde, en las ratas jóvenes, se recupera mayor proporción de ácidos grasos marcados tras la administración del ( $^{14}\text{C}$ )MVA-.

### 1.1. Influencia de la cantidad de MVA inyectada.

Como se observa en la tabla 1, son el hígado y los riñones los órganos que metabolizan mayoritariamente el MVA hacia lípidos insaponificables para todas las dosis inyectadas. Aunque el riñón aparece como el órgano con mayor actividad por gramo de tejido, la incorporación en el órgano completo es similar a la de hígado (tabla 2). En ambos órganos existe linealidad entre la actividad detectada y la cantidad de MVA inyectada, en el amplio margen estudiado (38-10000 nmol de (RS)MVA).

En la tabla 3 y en las figuras 1 y 2 se expresa la incorporación a diversos insaponificables aislados por cromatografía en capa fina. Mientras en hígado el colesterol es muy mayoritario -casi siempre supone más del 90% del total de lípidos insaponificables-, en riñón la radiactividad aparece distribuida mucho más equitativamente, siendo el escualeno el componente mayoritario para las cantidades más elevadas de MVA (tabla 3, figura 1). Cerebro, médula espinal y piel constituyen en este sentido casos intermedios -más próximo a hígado el cerebro, más cercano a riñón la piel-. En estos órganos la magnitud de la dosis no afectó apreciablemente a la distribución de la radiactividad.

La incorporación a la fracción saponificable (tabla 4) tuvo lugar fundamentalmente en los riñones, y era también apreciable en el hígado, mientras que resultó mucho menor en los demás órganos estudiados. El porcentaje medio de MVA incorporado por los riñones a lípidos saponificables fue de un 13.7%, en contraste con el 1.7% encontrado en el hígado.

Tabla 1. Incorporación de diferentes dosis de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables en diferentes tejidos de pollos de 9 días

nmol de (R)-MVA inyectados	nmol/g incorporados en 4 horas				
	Hígado	Riñones	Encéfalo	Médula espinal	Piel
20	0.47	0.37	0.02	0.14	0.02
50	3.12	8.78	0.06	0.25	0.24
100	7.42	13.83	0.22	0.60	0.29
200	12.75	36.92	0.43	0.74	1.61
800	41.67	153.85	1.12	1.98	1.98
1600	84.94	212.70	2.34	2.89	3.02
5000	258.40	968.50	4.84	11.74	5.15

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 20%.



Tabla 2. Incorporación de diferentes dosis de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables en hígado y riñones de pollos de 9 días

nmol de (R)MVA inyectados	nmol incorporados en 4 h a :	
	Hígado	Riñones
20	0.98	0.26
50	5.02	4.46
100	12.73	7.84
200	19.38	20.68
800	68.68	86.16
1600	149.06	149.95
5000	347.96	581.10

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 20%.

Tabla 3. Influencia de la dosis de (5-<sup>14</sup>C)MVA sobre los porcentajes relativos de radiactividad en los distintos lípidos insaponificables obtenidos 4 horas después de la inyección de MVA

nmol de (R)-MVA inyectados	HIGADO					RIÑONES				
	E	U	L	P	C	E	U	L	P	C
20	1	3	2	0	94	2	6	4	36	52
50	0	0	1	0	99	1	4	4	57	34
100	1	2	1	0	96	10	21	8	26	35
200	1	0	1	0	98	4	11	4	44	37
800	1	2	1	0	92	6	12	10	27	45
1600	4	2	2	0	92	38	14	16	9	23
5000	8	4	2	2	84	24	15	12	24	25

El fraccionamiento de los lípidos insaponificables se realizó por cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974). Los datos corresponden a la radiactividad encontrada en compuestos que migran como: E=escualeno; U=ubiquinona-10; L=lanosterol; P=lípidos insaponificables polares; C=colesterol. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 30%.

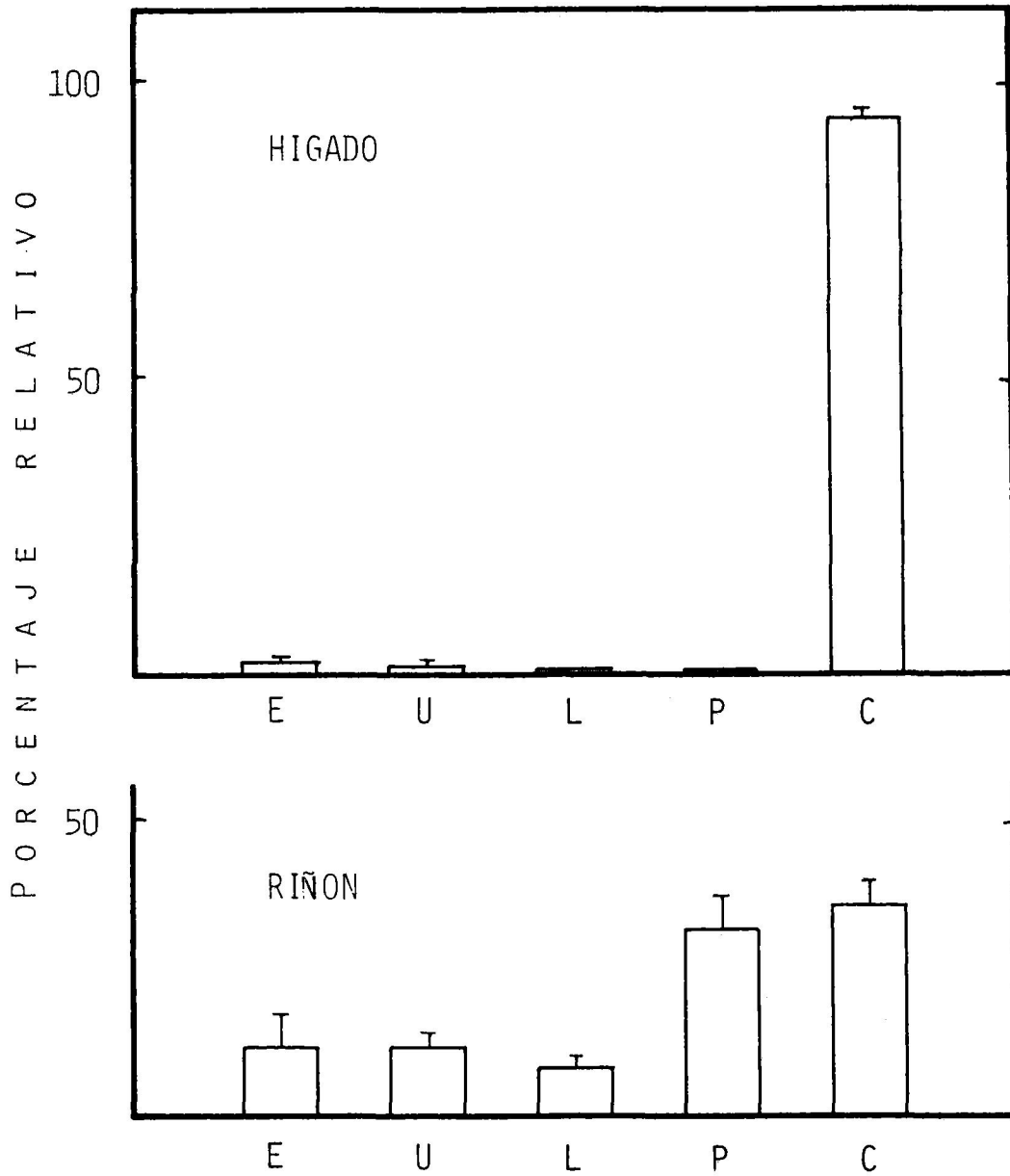


Figura 1. Porcentaje relativo de radiactividad acumulada en diversos lípidos insaponificables 4 h después de una inyección de MVA. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en cada tejido con diferentes dosis de MVA (7). E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina.

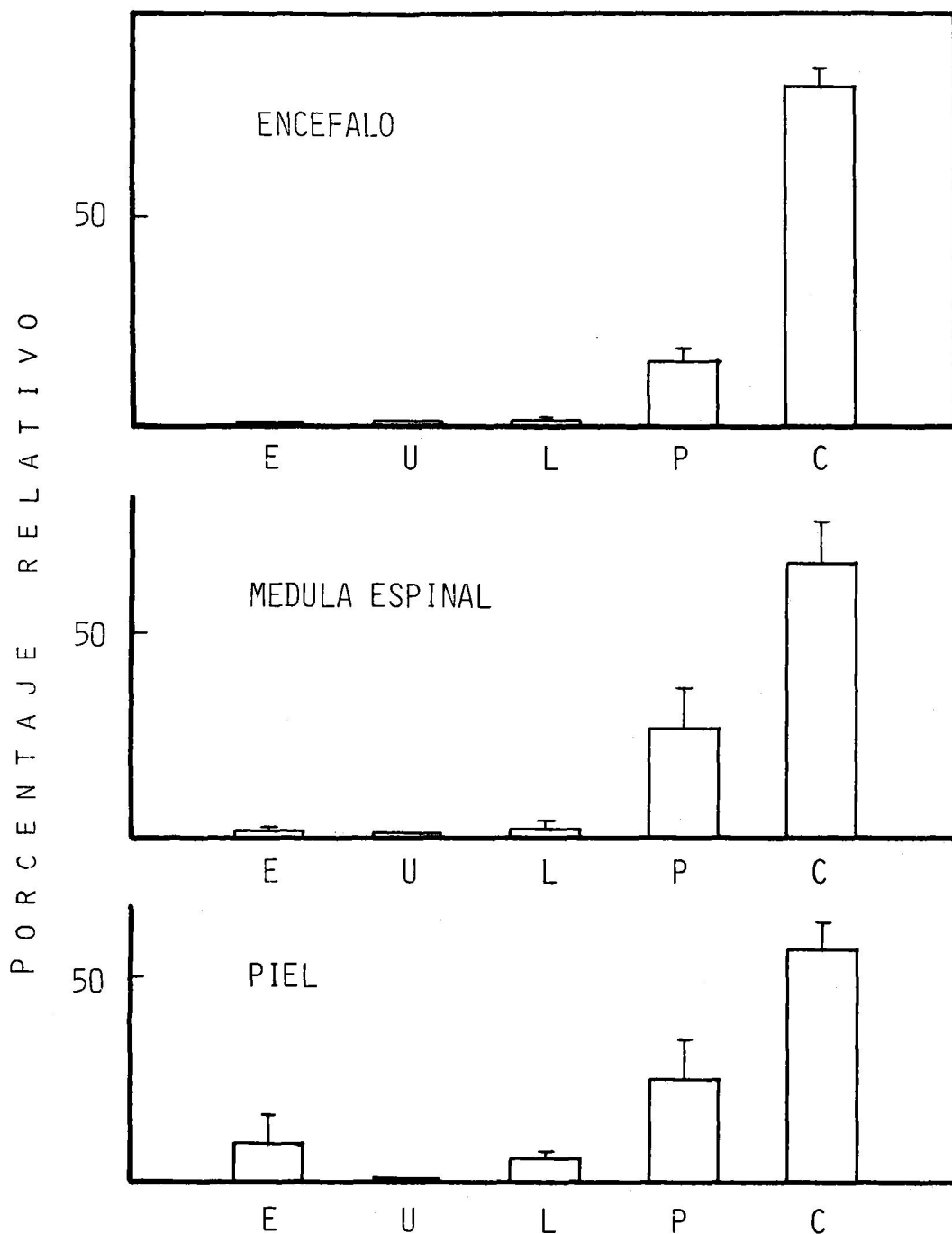


Figura 2 . Porcentaje relativo de radiactividad acumulada en diversos lípidos insaponificables 4 h después de una inyección de MVA. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en cada tejido con diferentes dosis (7) de MVA. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina.

Tabla 4. Incorporación de diferentes dosis de (5-<sup>14</sup>)MVA a lípidos saponificables en diferentes tejidos de pollos de 9 días

nmol de (R)-MVA inyectados	nmol incorporados en 4 horas			
	Por g de tejido		Por órgano total	
	Hígado	Riñones	Hígado	Riñones
20	ND	ND	ND	ND
50	0.028	1.479	0.041	0.751
100	0.049	2.912	0.084	1.651
200	0.142	4.802	0.216	2.689
800	0.751	21.968	1.236	12.302
1600	2.606	33.963	4.574	23.944
5000	8.164	74.326	13.879	44.596

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 30%. ND= no detectados.

En cuanto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  procedente del C-5 del MVA que espiraban los pollos, fue siempre proporcional a la dosis de MVA inyectada. La radiactividad ligada al  $\text{CO}_2$  -fruto de la actividad de la ruta cetogénica del MVA- supuso por término medio un  $(11.2 \pm 0.4)\%$  de la inyectada.

Esta, en principio sorprendente, proporcionalidad respecto a la cantidad de MVA administrada, incluso a dosis que pueden provocar concentraciones de MVA circulante muy superiores a las probablemente fisiológicas, también se ha observado en los últimos años en la incorporación de MVA "in vivo" a insaponificables de hígado de ratones, conejos y ratas (Edgren y Hellström 1972, Hellström y col. 1973). Wiley y col. (1977a), por su parte, observaron un incremento proporcionalmente mayor en la producción de  $\text{CO}_2$  que en la de esteroides al aumentar la dosis, pero sus resultados no son significativos por cuanto sólo ensayaron tres dosis en sendas ratas. Según Brunengraber y col. (1981), la captación por riñones perfundidos de rata de (R)MVA, su excreción en orina y su incorporación a lípidos aumentan linealmente con la concentración de MVA en el perfusato, dentro de los límites presumiblemente fisiológicos (hasta 500 pmol/ml). En cambio, la incorporación a esteroides exhibió cinética sigmoide, de forma que en el rango 80-500 pmol/ml, dicha incorporación aumentó 9 veces en los riñones de los machos y 30 en los de las hembras.

La influencia de la dosis sobre la incorporación a ácidos grasos fue estudiada por Edmond y Popják (1974), resultando lineal hasta para las extremadamente altas (15160 nmol/g de peso corporal). En opinión de estos autores, la concentración de interme-

diario derivado del ( $^{14}\text{C}$ )MVA a través del cual los ácidos grasos resultan marcados, debe ser muy grande en comparación incluso con las mayores dosis de MVA. La cantidad de cuerpos cetónicos en las ratas en desarrollo probablemente cumple este requisito (Hawkins y col. 1971).

En cualquier caso, nos pareció lo más sensato para posteriores experimentos elegir una dosis de 400 nmol de (R)MVA, suficientemente alta para que la radiactividad específica del MVA inyectado no se vea diluida de forma apreciable por el MVA no marcado de origen endógeno.

En principio, podría pensarse en administrar una dosis traza, de manera que estudiáramos el metabolismo del MVA circulante sin alterar sus niveles. Pero de esta forma podría ocurrir que observáramos el efecto conjunto de los cambios de actividad de las enzimas responsables de aquel metabolismo, y de las variaciones en los niveles de MVA circulante -resultante de la actividad HMG-CoA reductasa-, siéndonos imposible decidir cuál de ambos factores sería el causante de un determinado incremento o decremento de incorporación. Como decíamos, inyectando una cantidad suficientemente alta, apreciaremos sobre todo los cambios de actividades post-MVA.

## 1.2. Influencia del tiempo.

En los experimentos descritos hasta ahora, los pollos se mataron a las 4 horas de la inyección del MVA. Para seguir la evolución de la incorporación de la dosis de MVA elegida, se inyectaron a los pollos 400 nmol de (R)-(5- $^{14}\text{C}$ )MVA y se estudió la incorporación por la ruta de esteroides y por la cetogénica entre 15

minutos y 12 horas tras la inyección.

De nuevo el hígado y los riñones se mostraron como los órganos que acumulaban más insaponificables marcados (tabla 5). Este acúmulo fue máximo en el hígado a las 2 h, mientras que en los riñones casi no varió desde el minuto 30 (figura 3). Los valores encontrados probablemente representan un compromiso entre la formación de colesterol y su exportación o catabolismo (sobre todo en hígado).

La distribución de la radiactividad entre los distintos insaponificables se mostró dependiente del tiempo ensayado (tabla 6). En el hígado el colesterol volvió a ser el insaponificable más acumulado, si bien en los tiempos más cortos no era tan predominante porque había cierto acúmulo provisional de intermediarios como el escualeno, lanosterol y otros no identificados. Este mayor porcentaje inicial de escualeno también ha sido descrito en hígado de rata (Wiss y Wiss 1977b).

En el riñón la situación es muy distinta. Hasta las 4 h el escualeno es el producto acumulado en mayor proporción, y también es considerable la incorporación a lanosterol. Sólo a las 12 h predomina claramente el colesterol sobre ambos. Estas observaciones, junto a la ya comentada formación de más colesterol con dosis más bajas a las 4 h de la inyección, ponen de manifiesto la existencia en el riñón del pollo de etapas limitantes, "cuellos de botella", tras la formación de escualeno, de forma semejante a lo que ya se ha sugerido en la rata (Hellström y col. 1973, Raskin y Siperstein 1974).

En cerebro, piel y médula espinal el porcentaje de colesterol fue siempre el mayor sin grandes diferencias a partir de los 30 minutos (tabla 7).



Tabla 5. Incorporación de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables por diferentes tejidos de pollos de 9 días al cabo de diversos tiempos tras la inyección del MVA

Minutos tras la inyección	nmol de MVA incorporados/g				
	Hígado	Riñones	Encéfalo	Médula espinal	Piel
15	12.77	17.67	0.15	0.56	2.40
30	17.60	58.29	0.34	0.44	1.37
60	24.98	74.86	0.42	0.75	1.04
120	30.10	64.80	0.40	0.94	1.34
240	21.95	71.55	0.51	0.70	1.02
720	16.79	62.62	0.69	1.50	1.47

Se inyectaron 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 20%.

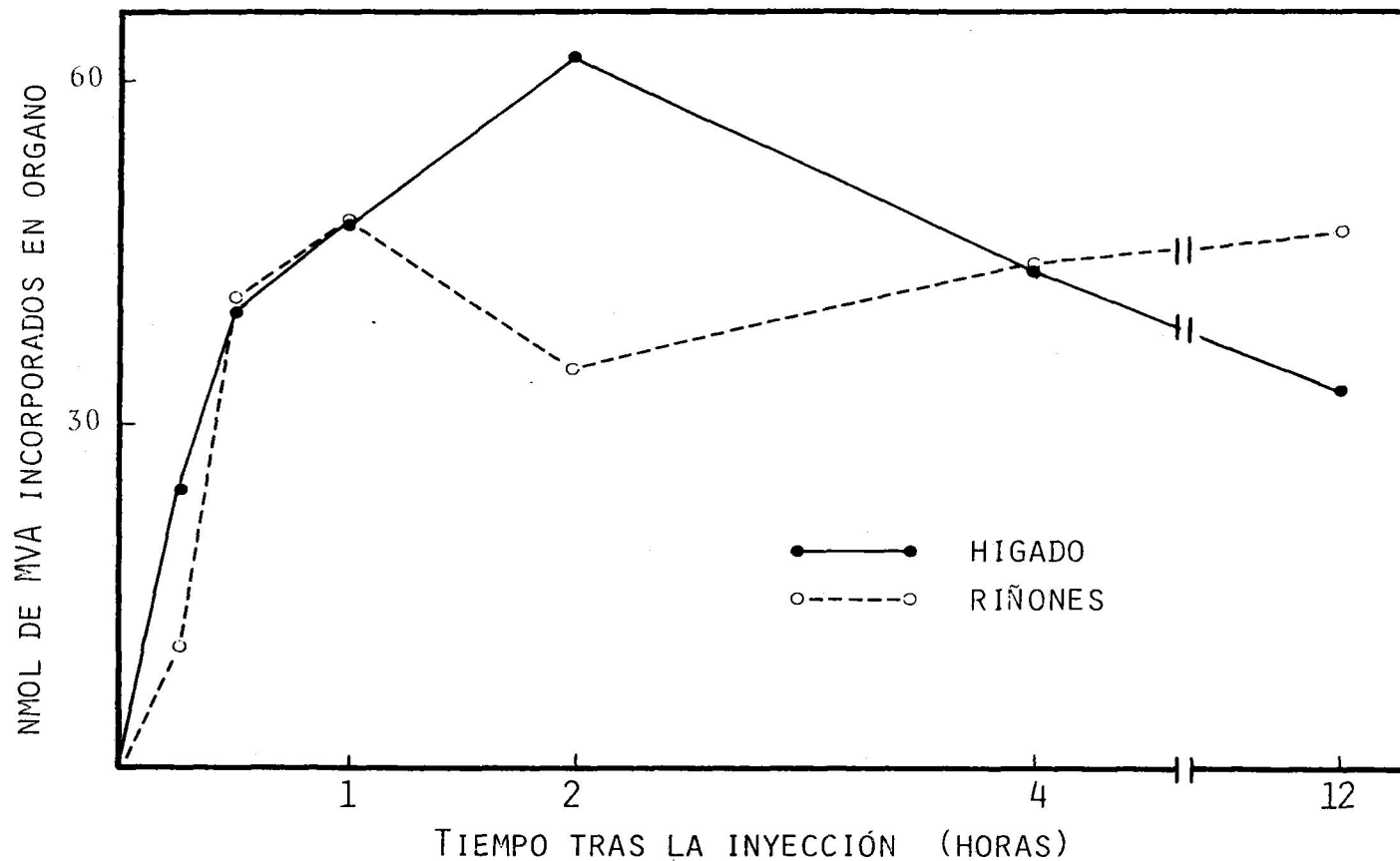


Figura 3. Incorporación de (5-<sup>14</sup>C)MVA en lípidos insaponificables de hígado y riñones de pollo diversos tiempos después de la inyección i.p. de MVA. Los resultados son la media de los obtenidos en dos experimentos; la diferencia entre ambos no excedió nunca del 30%.

Tabla 6. Porcentaje relativo de radiactividad recuperada en los diversos lípidos insaponificables obtenidos tras varios períodos de tiempo después de la inyección de 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA

Minutos tras la inyección	HIGADO					RIÑONES				
	E	U	L	P	C	E	U	L	P	C
15	1	4	7	22	67	41	21	17	10	11
30	7	3	3	1	87	33	16	17	23	11
60	3	2	2	0	93	32	14	18	22	14
120	0	1	1	0	98	30	21	15	18	16
240	1	1	1	0	96	30	26	10	10	23
720	1	1	1	0	96	2	28	6	11	53

El fraccionamiento de los lípidos insaponificables se realizó por cromatografía en capa fina. Los datos corresponden a la radiactividad encontrada en compuestos que migran como: E=escualeno; U=ubiquinona; L=lanosterol; P= lípidos insaponificables polares; C= colesterol. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 30%.

Tabla 7. Porcentaje relativo de radiactividad recuperada en los diversos lípidos insaponificables obtenidos tras varios períodos de tiempo después de la inyección de 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA

Minutos tras la inyección	ENCEFALO					MEDULA					PIEL				
	E	U	L	P	C	E	U	L	P	C	E	U	L	P	C
15	0	0	4	4	92	0	6	4	24	66	0	13	13	26	48
30	5	0	8	16	71	5	1	7	30	57	0	6	5	35	54
60	0	0	6	15	79	1	2	1	34	62	1	7	9	26	57
120	0	0	6	4	90	0	0	0	42	58	3	9	3	39	46
240	0	1	2	16	81	0	0	0	25	75	2	12	12	17	58
720	0	0	0	16	84	0	4	1	15	80	0	5	6	25	65

El fraccionamiento de los lípidos insaponificables se realizó por cromatografía en capa fina. Los datos corresponden a la radiactividad encontrada en compuestos que migran como: E=escualeno; U=ubiquinona; L=lanosterol; P=lípidos insaponificables polares; C=colesterol. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 40%.

La radiactividad en la fracción saponificable (tabla 8, figura 4) aumentó linealmente entre los 15 y 60 minutos en el hígado, y descendió a partir de las 2 horas. De nuevo la capacidad del riñón para incorporar MVA a lípidos saponificables fue superior a la hepática. También se produjo en los riñones un descenso a las 12 horas, que puede deberse (en hígado y riñones) a la utilización de los ácidos grasos como fuente de energía, dadas las condiciones de ayuno en que queda el pollo tras la inyección. Esto explicaría la evolución con el tiempo de la distribución relativa de la radiactividad del MVA entre la ruta de esteroides y la cetogénica (tabla 9).

Los datos de la figura 5 muestran que el porcentaje de MVA incorporado "in vivo" a lípidos saponificables (en relación a la suma de éstos y los insaponificables) fue superior en los tres órganos de origen ectodérmico, especialmente en la médula espinal, de forma similar a como ocurre en ratas de 9 días (Edmond y Popják 1974). Estos resultados sugieren una contribución del metabolismo del MVA por la ruta cetogénica en esos órganos durante el desarrollo neonatal al aporte de cuerpos cetónicos, a pesar de que se cree que la mielinización ha concluido en los pollos de 9 días. Recordemos que durante la formación de la mielina los cuerpos cetónicos son una fuente importante de energía y de esqueletos carbonados para el sistema nervioso central (Edmond 1974).

La cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  recogida de la espiración del pollo -procedente de la actividad de la ruta cetogénica del MVA- aumentó hasta las 4 h, momento en el que suponía el 11.5% de la radiactividad inyectada (figura 6). No observamos el breve período "lag" que frecuentemente (Fogelman y col. 1975, Wiley y col. 1977a, 1979, Feingold y col. 1980b), pero no siempre (Brady y col. 1983)

Tabla 8. Incorporación de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos saponificables por diferentes tejidos de pollos de 9 días al cabo de diversos tiempos tras la inyección del MVA

Minutos tras la inyección	nmol de MVA incorporados/g				
	Hígado	Riñones	Encéfalo	Médula espinal	Piel
15	0.304	3.073	0.022	0.304	0.189
30	0.524	10.605	0.087	0.389	0.263
60	0.968	13.361	0.105	1.784	0.491
120	1.116	10.256	0.136	1.694	0.408
240	0.359	12.793	0.108	1.584	0.792
720	0.098	7.059	0.106	1.641	1.879

Se inyectaron 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 25%.

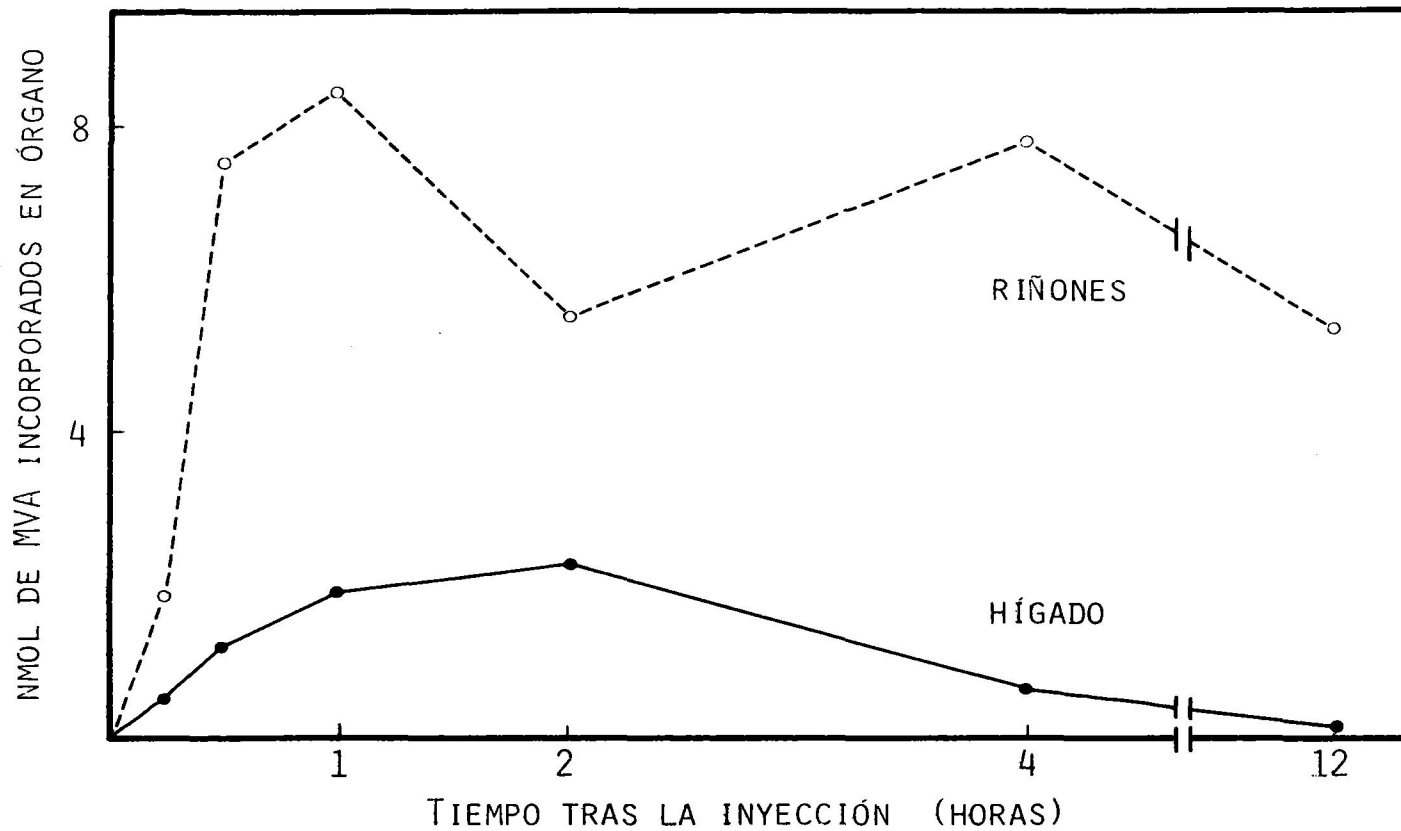


Figura 4 . Incorporación de (5-<sup>14</sup>C)MVA en lípidos saponificables de hígado y riñones de pollo diversos tiempos después de la inyección i.p. de MVA. Los resultados son la media de los obtenidos en dos experimentos; la diferencia entre ambos no excedió nunca del 35%.

Tabla 9. Incorporación relativa de MVA por la ruta de esteroides y por la cetogénica en hígado y riñones en los diversos tiempos

Minutos tras la inyección	% de MVA incorporado a			
	Lípidos insaponific.		Lípidos saponificables	
	Hígado	Riñones	Hígado	Riñones
15	97.67	85.19	2.33	14.81
30	97.11	84.61	2.89	15.39
60	96.27	84.86	3.73	15.14
120	96.42	86.34	3.58	13.66
240	98.39	84.81	1.61	15.17
720	99.42	89.97	0.58	10.13

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos.



aparece en la rata. De esta forma se ha demostrado la existencia de la ruta cetogénica del MVA en un no-mamífero por vez primera, así como su importancia cuantitativa.

Sin embargo, el método "in vivo" no nos permite conocer la contribución relativa de cada órgano al metabolismo del MVA por esa ruta. El alto porcentaje relativo de lípidos saponificables marcados que se detectaron en médula espinal, cerebro y piel procede, muy probablemente, de la formación de cuerpos cetónicos a partir del MVA en otros órganos, que son transportados a estos tejidos de origen ectodérmico para su metabolismo. Así pues, se nos hacía preciso un estudio "in vitro" de los órganos que "in vivo" se mostraron más activos.

No obstante, en vista de las diferencias iniciales encontradas con la rata en el papel relativo de hígado y riñón, nos pareció necesario un estudio previo "in vivo" que considerase más órganos, por si en el pollo hubiera algún otro con una contribución apreciable. En este y posteriores estudios, seleccionamos las condiciones óptimas para hígado y riñones: un tiempo de 90 minutos con una dosis de 400 nmol de (R)MVA.

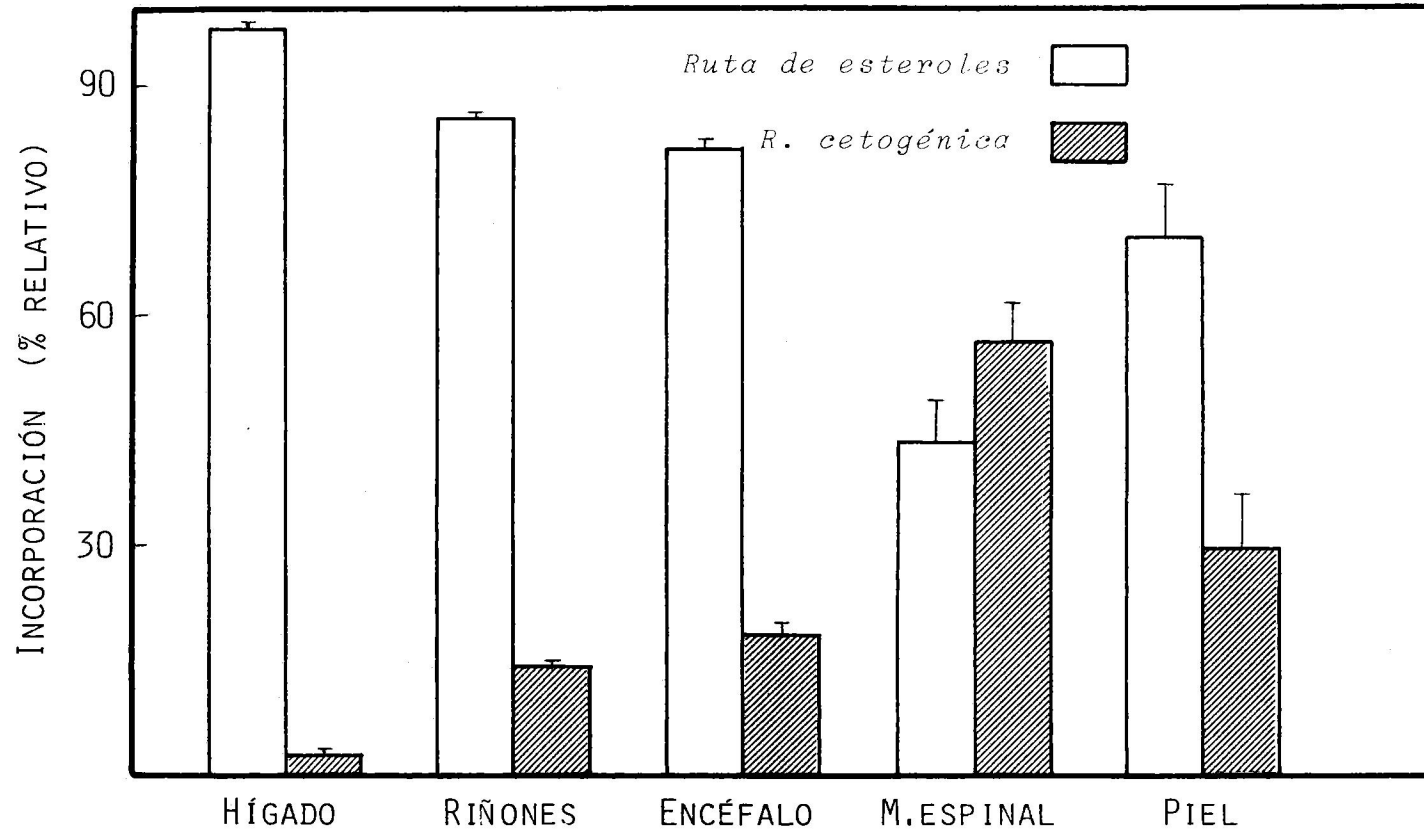


Figura 5 . Distribución del metabolismo del MVA entre la ruta de esteroides y la ruta cetogénica en diferentes tejidos de pollos de 9 días. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los observados en los distintos tiempos (6) ensayados.

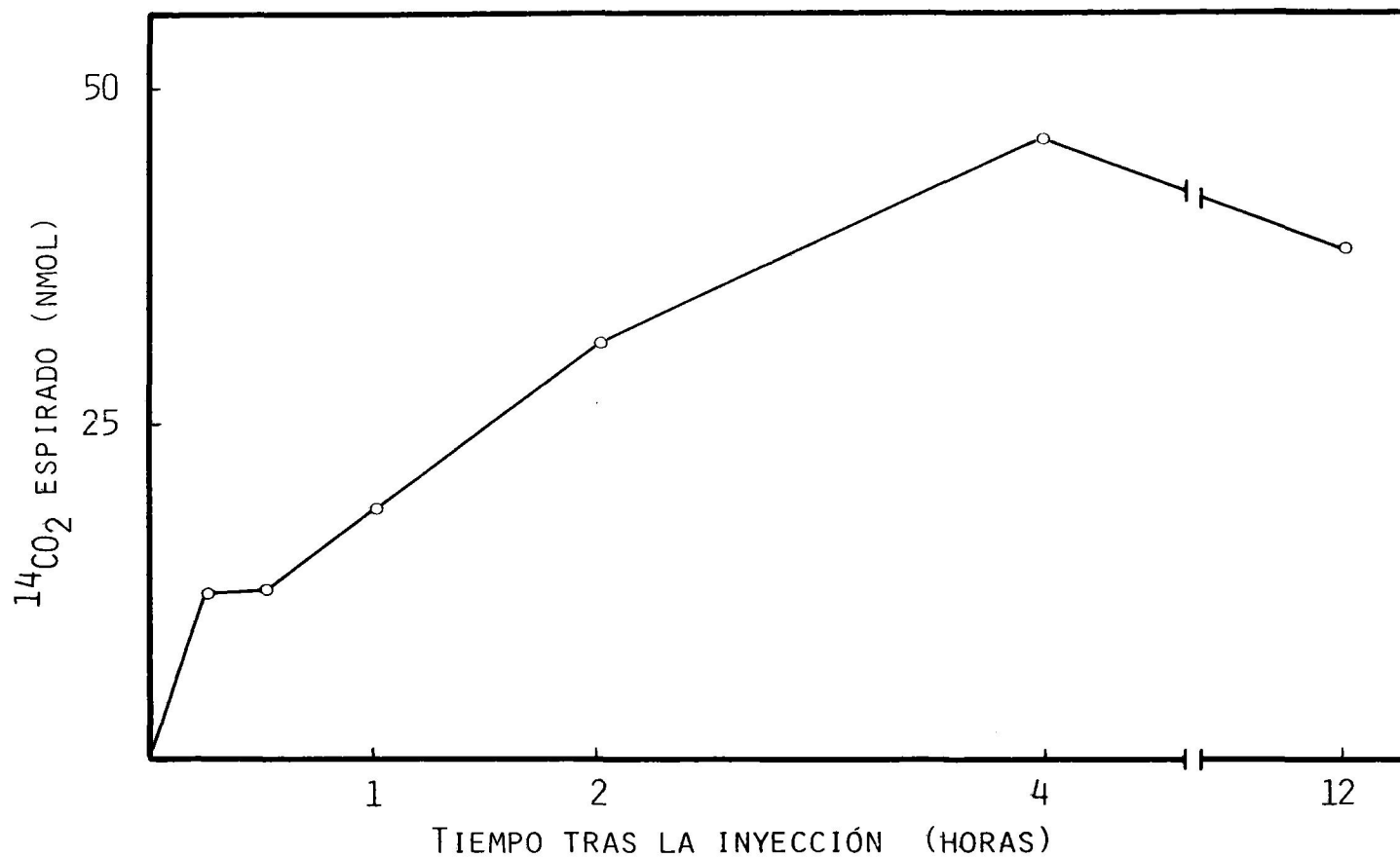


Figura 6. Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(R)-(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$  por pollos de nueve días diversos tiempos después de la inyección del MVA. Los resultados son la media de los obtenidos en dos experimentos; la diferencia entre ambos fue siempre inferior al 30%.

## 2. Distribución tisular del metabolismo del mevalonato circulante.

El estudio se hizo con pollos de 10 días. Como se puede ver en la tabla 10, de los 16 tejidos estudiados el hígado y los riñones eran, con mucho, los más activos en el acúmulo de insaponificables derivados del MVA. Las diferencias entre las actividades relativas de estos órganos y los correspondientes de rata las comentaremos más adelante.

Si atendemos a la aparición de lípidos saponificables (tabla 11), quedan exclusivamente los riñones en lugar destacado, con un acúmulo por gramo de peso fresco más de 10 veces superior al de cualquier otro tejido.

Nuestros datos confirmaron la participación fundamental de hígado y riñones de pollo en el metabolismo del MVA circulante (al menos en los pollos de 10 días) por la ruta de esteroides. Por la ruta cetogénica, los resultados de incorporación a saponificables hacen pensar que el riñón es el órgano donde tiene lugar mayoritariamente (a partir del MVA circulante), pero existe la posibilidad de que no procedan tales lípidos exclusivamente de la ruta cetogénica del MVA, puesto que entre ellos puede haber farnesoico -formado por la hidrólisis y posterior oxidación de farnesil-PP-, aunque en la rata parece ser que esto no ocurre.

Era manifiesta la necesidad de realizar una cuantificación "in vitro" de la actividad del desvío cetogénico del MVA, al menos en hígado y riñones, para confirmar tales resultados. Además, ya se ha discutido la conveniencia, para futuros estudios, de disponer de estas técnicas que evitan las dificultades de interpretación de los datos obtenidos "in vivo" por el posible movimiento de intermediarios y productos de las dos rutas estudiadas.

Tabla 10. Contribución de diferentes tejidos del pollo a la incorporación *in vivo* del MVA a lípidos insaponificables totales, en pollos de 10 días

Tejido	Incorporación de (R)-(5- <sup>14</sup> C)MVA	
	nmol	nmol/g
Riñón	48.08 <sup>±</sup> 5.98	57.99 <sup>±</sup> 1.09
Hígado	41.33 <sup>±</sup> 1.90	17.93 <sup>±</sup> 0.70
Mucosa duodenal		6.59 <sup>±</sup> 1.09
Músc.liso duod.		2.28 <sup>±</sup> 0.13
Testículos	1.34 <sup>±</sup> 0.18	2.17 <sup>±</sup> 0.29
Tejido adiposo		2.15 <sup>±</sup> 1.15
Sangre		1.10 <sup>±</sup> 0.02
Páncreas	0.74 <sup>±</sup> 0.07	1.66 <sup>±</sup> 0.04
Encéfalo	0.67 <sup>±</sup> 0.05	0.57 <sup>±</sup> 0.03
Corazón	0.62 <sup>±</sup> 0.10	1.41 <sup>±</sup> 0.36
Piel		0.94 <sup>±</sup> 0.14
Pulmón	0.49 <sup>±</sup> 0.05	1.18 <sup>±</sup> 0.16
Vesíc. biliar	0.23 <sup>±</sup> 0.03	1.88 <sup>±</sup> 0.19
Bazo	0.16 <sup>±</sup> 0.06	2.42 <sup>±</sup> 0.28
Médula espinal	0.15 <sup>±</sup> 0.02	0.91 <sup>±</sup> 0.15
Adrenes	0.05 <sup>±</sup> 0.01	1.23 <sup>±</sup> 0.03

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de las cantidades incorporadas en tres pollos de 10 días a los 90 minutos de la inyección de 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA.

Tabla 11. Contribución de diferentes tejidos del pollo a la incorporación *in vivo* del MVA a lípidos saponificables en pollos de 10 días

Tejido	Incorporación de (R)-(5- <sup>14</sup> C)MVA	
	nmol	nmol/g
Riñón	9.99 <sup>±</sup> 0.42	12.21 <sup>±</sup> 1.25
Sangre		1.09 <sup>±</sup> 0.84
Hígado	1.97 <sup>±</sup> 0.08	0.77 <sup>±</sup> 0.02
Mucosa duodenal		1.05 <sup>±</sup> 0.27
Encéfalo	0.185 <sup>±</sup> 0.076	0.156 <sup>±</sup> 0.060
Corazón	0.285 <sup>±</sup> 0.032	0.636 <sup>±</sup> 0.014
Músc.liso duod.		0.284 <sup>±</sup> 0.015
Piel		0.294 <sup>±</sup> 0.100
Vesíc. biliar	0.186 <sup>±</sup> 0.060	1.440 <sup>±</sup> 0.173
Testículos	0.182 <sup>±</sup> 0.123	0.294 <sup>±</sup> 0.201
Pulmón	0.089 <sup>±</sup> 0.018	0.207 <sup>±</sup> 0.005
Páncreas	0.078 <sup>±</sup> 0.037	0.182 <sup>±</sup> 0.096
Médula espinal	0.088 <sup>±</sup> 0.020	0.450 <sup>±</sup> 0.119
Bazo	0.017 <sup>±</sup> 0.007	0.221 <sup>±</sup> 0.009
Adrenes	0.006 <sup>±</sup> 0.003	0.156 <sup>±</sup> 0.046
Tejido adiposo	0.000 <sup>±</sup> 0.000	0.000 <sup>±</sup> 0.000

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de las cantidades incorporadas en tres pollos de 10 días a los 90 min de la inyección de 400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA. El desprendimiento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> durante el mismo período de tiempo fue de (7.44<sup>±</sup>0.39) nmol.

3. Puesta a punto del método de estudio "in vitro" de la incorporación del mevalonato.

Atendiendo a nuestros requerimientos, nos interesaba un procedimiento que cumpliera lo mejor posible, entre otros, estos requisitos:

- Acercarse a las condiciones "in vivo" conservando la integridad celular.
- Proporcionar un sistema de medida de la actividad de la ruta cetogénica del MVA.

De entre los métodos descritos en la bibliografía, el de Righetti y col. (1976) nos pareció -incluso con las reservas que hicimos en la introducción- el mejor: se trabaja con cortes de tejido y se determina un índice de la actividad de la ruta cetogénica del MVA midiendo la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (2- $^{14}\text{C}$ )MVA o (5- $^{14}\text{C}$ )MVA.

3.1. Influencia del peso de tejido.

Los resultados se recogen en la figura 7. La incorporación de MVA a lípidos insaponificables fue lineal (aproximadamente) hasta 150 mg de cortes de hígado y 200 mg de cortes de riñón, siendo siempre mayor en los últimos. La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  fue proporcional a la cantidad de tejido en todos los casos. Para los experimentos posteriores, elegimos los pesos citados para cada órgano.

3.2. Influencia de la concentración de mevalonato.

La relación concentración-incorporación de MVA puede orientarnos sobre la respuesta del hígado y los riñones a los cambios de los niveles de MVA disponibles. Atendiendo a los resultados que obtuvimos "in vivo", ensayamos un rango de concentracio-

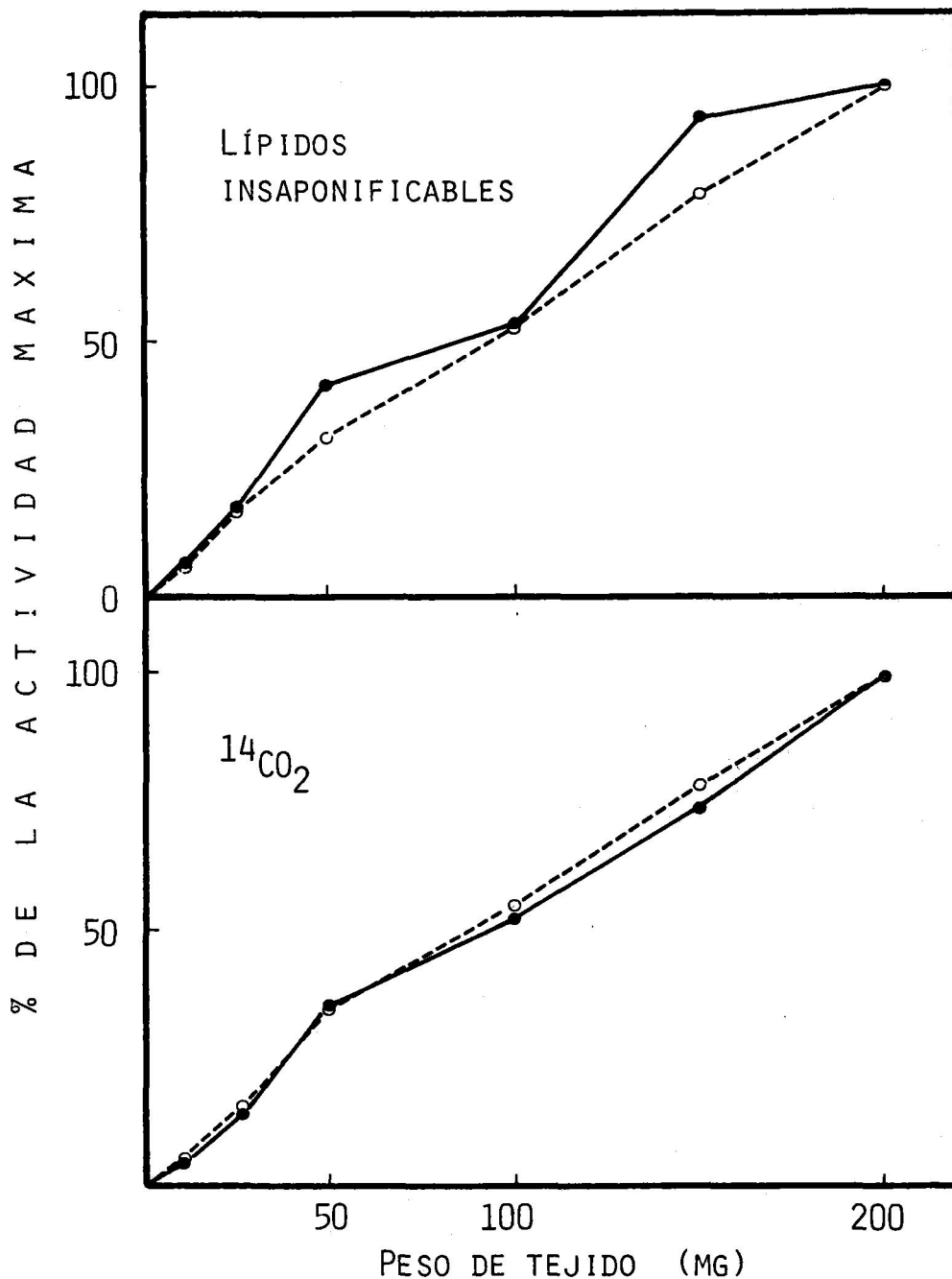


Figura 7. Influencia de la cantidad de cortes de tejido sobre la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> y lípidos insaponificables a partir de (2-<sup>14</sup>C)MVA. Los valores son la media de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos fue siempre inferior al 15%.  
( ●—● ) hígado; ( o-----o ) riñón.



nes muy amplio, buscando la zona de cambio de cinética desde un orden 1 a un orden 0. Ensayamos así concentraciones de (2-<sup>14</sup>C)-(RS)MVA desde 0.04 mM hasta un valor máximo -muy elevado- de 8 mM (16000 nmol en el matraz).

Contrariamente a la linealidad encontrada en las experiencias "in vivo", en la incorporación a lípidos insaponificables (figura 8) apreciamos un fenómeno de saturación, resultando una cinética de apariencia hiperbólica, tal como parece ocurrir en la rata (Shah 1973, Raskin y Siperstein 1974). La diferencia con los resultados obtenidos en los pollos vivos puede deberse sencillamente a que "in vitro" la concentración de MVA fue mayor.

Para el cálculo de las Km y Vm aparentes (denominaciones que daremos a la concentración de MVA que origina una velocidad de incorporación semimáxima y a la velocidad máxima de incorporación, respectivamente) el mejor método consiste en hallar la mejor hipérbola por mínimos cuadrados, en lugar de seguir los procedimientos usuales de transformación de las variables para conseguir una relación lineal (v. gr., método de Lineweaver-Burk, de Eadie-Hofstee, etc.) (Christian y Tucker 1983). Para la obtención de la hipérbola construimos un programa de ordenador que busca la mejor ecuación mediante una serie de aproximaciones sucesivas convergentes.

La incorporación a lípidos insaponificables en hígado (figura 8) exhibía una Km aparente de 3.46 mM y una Vm aparente de 333 nmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. El riñón (figura 8), aunque dió una Vm aparente inferior a la del hígado (195 nmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), mostró una Km aparente unas 10 veces menor (0.332 mM). Esto supondría que, si el flujo de MVA circulante hacia las células hepáticas y renales fuera

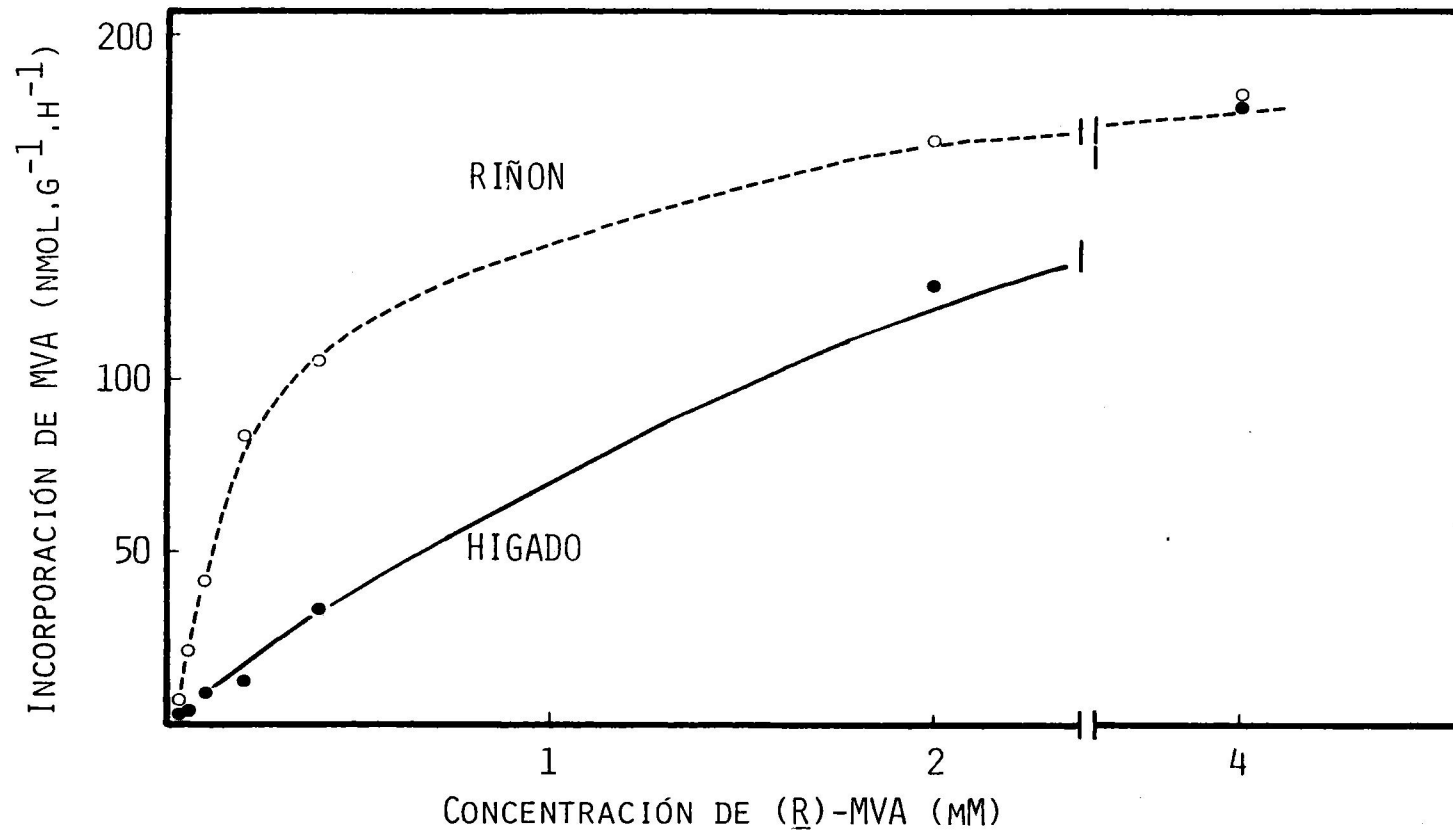


Figura 8 . Influencia de la concentración de MVA sobre su incorporación a lípidos insaponificables por cortes de hígado y riñón. Cada punto representa la media de los valores obtenidos en dos experiencias; la diferencia entre ambos fue siempre inferior al 10%. Mediante el método de mínimos cuadrados se obtuvieron los siguientes parámetros: Hígado,  $K_m \text{ ap.} = 3461 \mu\text{M}$ ;  $V_m \text{ ap.} = 333 \text{ nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Riñón,  $K_m \text{ ap.} = 332 \mu\text{M}$ ;  $V_m = 195 \text{ nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

similar, y el acceso del sustrato a las células en los experimentos "in vitro" fuera semejante a como sucede en el animal íntegro, el riñón metabolizaría el MVA circulante por la ruta de esteroides más activamente que el hígado, a no ser que sus niveles fuesen altísimos.

Sin embargo, pensamos que la situación más plausible es la siguiente. Como la fuente de MVA del riñón es sobre todo el MVA circulante, lo más probable es -a tenor de los experimentos "in vivo"- que su incorporación a insaponificables responda linealmente a la cantidad de sustrato que le llega, ya que parece difícil que se alcancen concentraciones tan altas como las necesarias para entrar en la zona de saturación. El hígado tiene acceso, en cambio, a un flujo de MVA mucho mayor, sintetizado en el propio órgano. Los cambios hepáticos de actividad HMG-CoA reductasa deben ser más decisivos sobre la zona de la curva de concentración en que se encuentra que los niveles de MVA circulantes.

En la rata, los valores de las  $K_m$  aparentes renal (0.19 mM) y hepática (1.48 mM) guardan una relación similar a la encontrada por nosotros en los pollos, pero la  $V_m$  de hígado de rata ( $1428 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) es muy superior a la de riñón ( $168 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (Raskin y Siperstein 1974).

Si prestamos atención a la incorporación a colesterol (y otros C-27 esteroides), lanosterol (y otros C-30 esteroides) y escualeno (tabla 12), observaremos que el primero es el más activamente formado en hígado, aunque no tanto a una concentración 8mM de (RS)MVA, con la que se acumula escualeno y lanosterol, seguramente por la saturación de alguna enzima distal de la ruta. El mismo fenómeno se ha observado en la rata (Raskin y Siperstein 1974). No obstante, el porcentaje medio de colesterol (43%) es aún

Tabla 12. Influencia de la concentración de MVA sobre el porcentaje relativo de incorporación a distintos insaponificables por cortes de hígado y de riñón de pollos de 9 días

Concentración de (R)-MVA ( $\mu$ M)	HIGADO					RIÑONES				
	E	U	L	P	C	E	U	L	P	C
16	2	2	2	45	49	4	4	6	69	17
43	4	3	4	46	43	7	6	6	70	11
93	2	2	3	55	38	33	7	13	34	13
193	4	5	5	40	46	34	9	12	34	11
393	3	5	5	33	54	52	10	18	7	13
1993	7	8	8	46	31	42	9	21	9	19
3993	11	8	7	43	31	--	--	--	--	--
Medias :	$5^{\pm 1}$	$5^{\pm 1}$	$5^{\pm 1}$	$43^{\pm 2}$	$42^{\pm 3}$	$29^{\pm 8}$	$8^{\pm 1}$	$12^{\pm 3}$	$37^{\pm 11}$	$14^{\pm 1}$

El fraccionamiento de los lípidos insaponificables se realizó por cromatografía en capa fina. Los datos corresponden a la radiactividad encontrada en compuestos que migran como: E=escualeno; U=ubiquinona-10; L=lanosterol; P=lípidos insaponificables polares; C=colesterol. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 20%.

muy inferior al hallado "in vivo" (aproximadamente un 95%).

En riñón el escualeno es, salvo a las concentraciones inferiores, el insaponificable más abundante. Asimismo el lanosterol es mucho más abundante que en hígado; en el riñón llega a alcanzar proporciones similares a las de colesterol, mayores cuanto mayor es la dosis. Todo esto, junto a lo ya descrito "in vivo", apunta a la existencia de un "cuello de botella" en riñón entre lanosterol y colesterol.

Hay que resaltar que, tanto en hígado como en riñón (en éste, sobre todo a pequeñas concentraciones) aparece "in vitro" -mucho más que "in vivo" - una considerable proporción de insaponificables no identificados de naturaleza polar (con Rf inferior al del colesterol), sobre cuya naturaleza se tratará posteriormente. Esto último cabe decirlo también de los compuestos que migran como la ubiquinona-10 en la cromatografía en capa fina. En todo caso, la proporción relativa de estos compuestos, así como la de escualeno y lanosterol, aumenta al crecer la concentración de MVA en el medio, tanto en hígado como en riñón.

Como ya se ha dicho, en estos experimentos utilizamos como sustrato (2-<sup>14</sup>C)MVA. Así pues, la medida del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> procedente de la ruta cetogénica exige una corrección del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> total medido, tal como se explicó en "Procedimientos experimentales". De esta forma, en el hígado resultaron valores ínfimos e incongruentes, que no presentamos. Ello nos decidió a utilizar en lo posible (5-<sup>14</sup>C)MVA.

Tal sustrato lo empleamos por vez primera para medir la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por cortes de riñón. La incorporación de la radiactividad al CO<sub>2</sub> por la ruta cetogénica

en riñón (tabla 13) supuso, para las concentraciones inferiores, más del 6% de la de (R)MVA disponible. Parece pues que, como sucede en la rata, los riñones del pollo son los órganos mayoritariamente implicados en el metabolismo del MVA circulante por la ruta cetogénica.

Pero si esto cabía esperarlo, no ocurría así con la relación actividad-concentración observada. Sorprendentemente, nuestros valores no se ajustaban bien a ninguna ecuación de Michaelis-Menten (mejor % medio de desviación entre los valores obtenidos y los calculados = 14.7%). Como en cambio la distribución de valores tenía apariencia sigmoïdal, realizamos un programa de ordenador para la búsqueda de los coeficientes de la ecuación que da cuenta de la mayoría de los casos de cinética de este tipo (Ferdinand 1966):

$$v = \frac{i(S) + j(S)^2}{k + l(S) + m(S)^2}$$

El ajuste (véase la tabla 13) fue muy satisfactorio (% medio de desviación = 4.38%): la relación parece efectivamente sigmoïdal. Lo cual plantea las preguntas: ¿a qué se debe? y ¿qué sentido tiene?.

Si todas las enzimas pertenecientes a una ruta presentan cinética hiperbólica, la velocidad de aparición del último producto no sigue nunca una cinética sigmoïdal. Sólo se consigue ésta haciendo sigmoïdal el comportamiento de alguna etapa. ¿Qué etapa puede tener tal característica en la ruta cetogénica de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA?. Debe estar localizada antes de la combustión del acetil-CoA en el ciclo de los ácidos tri-

Tabla 13. Influencia de la concentración de (5-<sup>14</sup>C)MVA sobre la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por la ruta cetogénica en cortes de riñón

Conc. de (R)-MVA (μM)	A Produc.de CO <sub>2</sub> (nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	%relativo inc. a CO <sub>2</sub>	Curvas ajustadas		
			B	C	A.100/(MVA)
16	0.44	5	0.69	0.46	2.75
43	3.38	13	1.79	2.71	7.86
93	7.13	15	3.68	8.37	7.67
193	17.59	17	6.98	16.85	9.11
393	27.19	20	12.12	23.85	6.92
1993	29.51	15	28.26	30.04	1.48
3993	29.46	14	33.79	30.75	0.74

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 10%. El % relativo incorporado a CO<sub>2</sub> se calculó como A.100/(A+produc. de insapon.). Las columnas B y C resultan del ajuste a nuestros datos por mínimos cuadrados de la ecuación de una hipérbola y de una sigmoide, respectivamente.

carboxílicos, porque Arce y col. (1982) han demostrado en cortes de riñón de pollo que tal combustión transcurre según el modelo de Michaelis y Menten. En consecuencia, parece que es la cinética de la vía de síntesis de acetil-CoA a partir del dimetilalil-PP la que determina la forma de nuestra curva (no puede ser una etapa entre MVA y el punto de bifurcación de las rutas de esteroides y cetogénica porque aparecería sigmoidal la incorporación a insaponificables).

Una posibilidad teórica es que esa cinética viniese provocada por la saturación de la ruta de esteroides. No parece así, ya que la pendiente de la curva en la que representamos velocidad de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por la ruta cetogénica frente a la concentración de MVA aumenta cuando esta concentración es muy inferior a la  $K_m$  aparente de la formación de insaponificables.

Resulta tentador proponer un significado regulador para la cinética sigmoidal de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$ . La ruta cetogénica del MVA podría amortiguar el aumento de la síntesis de insaponificables en riñón tras un incremento en los niveles de MVA circulante, al desviar una cantidad proporcionalmente mayor de intermediarios (como se ve en la tabla 13). Pero no creemos que esta hipotética válvula de escape sea una realidad muy efectiva, sencillamente porque no se refleja este efecto en la cinética de producción de insaponificables. Hay que tener en cuenta que la  $V_m$  aparente de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por la ruta cetogénica es de sólo  $31 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  frente a los  $195 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  de  $V_m$  aparente de la síntesis de insaponificables (aunque la primera, debido a que no todo el acetil-CoA se transforma en  $\text{CO}_2$  y a la posible reincorporación de éste en otros compuestos (Kopito y col. 1984), sea probablemente inferior a la actividad real de la ruta cetogénica).



Otra posibilidad muy sugestiva es la de una regulación coordinada de la ruta cetogénica y de otras vías alternativas del metabolismo del MVA. Imaginemos una situación en la que la actividad HMG-CoA reductasa hepática y, por ende, la producción de MVA, está inhibida. La cinética sigmoideal del desarrollo cetogénico podría hacer que el descenso de actividad de esta ruta fuera -si el cambio de concentraciones se produce en la zona adecuada de la curva- superior al que tendría lugar si la cinética fuese hiperbólica, dejando más sustrato disponible para las otras rutas, cuya actividad normal "peligra" por la inhibición de la reductasa. Sería interesante un estudio experimental para contrastar la veracidad de esta hipótesis. (Hay que hacer notar que en las ratas la cinética de la ruta cetogénica no parece sigmoideal (Bardenheier y Popják 1977)).

### 3.3. Influencia del tiempo de incubación.

La síntesis de lípidos insaponificables (figura 9) guarda una relación lineal con el tiempo hasta los 120 minutos tanto en cortes renales como en los hepáticos. Esta proporcionalidad inicial la han observado algunos autores en ratas (Bardenheier y Popják 1977, Edwards y col. 1977), aunque otros detectaron una relación sigmoideal (Gibbons 1977).

En el hígado (tabla 14), en concordancia con los resultados de Erdman y col.(1977) en ratas, aumenta la proporción de colesterol a las 2 h, a costa del lanosterol y del escualeno. En los cortes de riñón (tabla 14) se produjo a lo largo del tiempo un acusado descenso de la proporción de escualeno y lanosterol sin aumentar el colesterol, sino los compuestos no identificados de Rf cercano a 0 (es decir, de naturaleza polar).

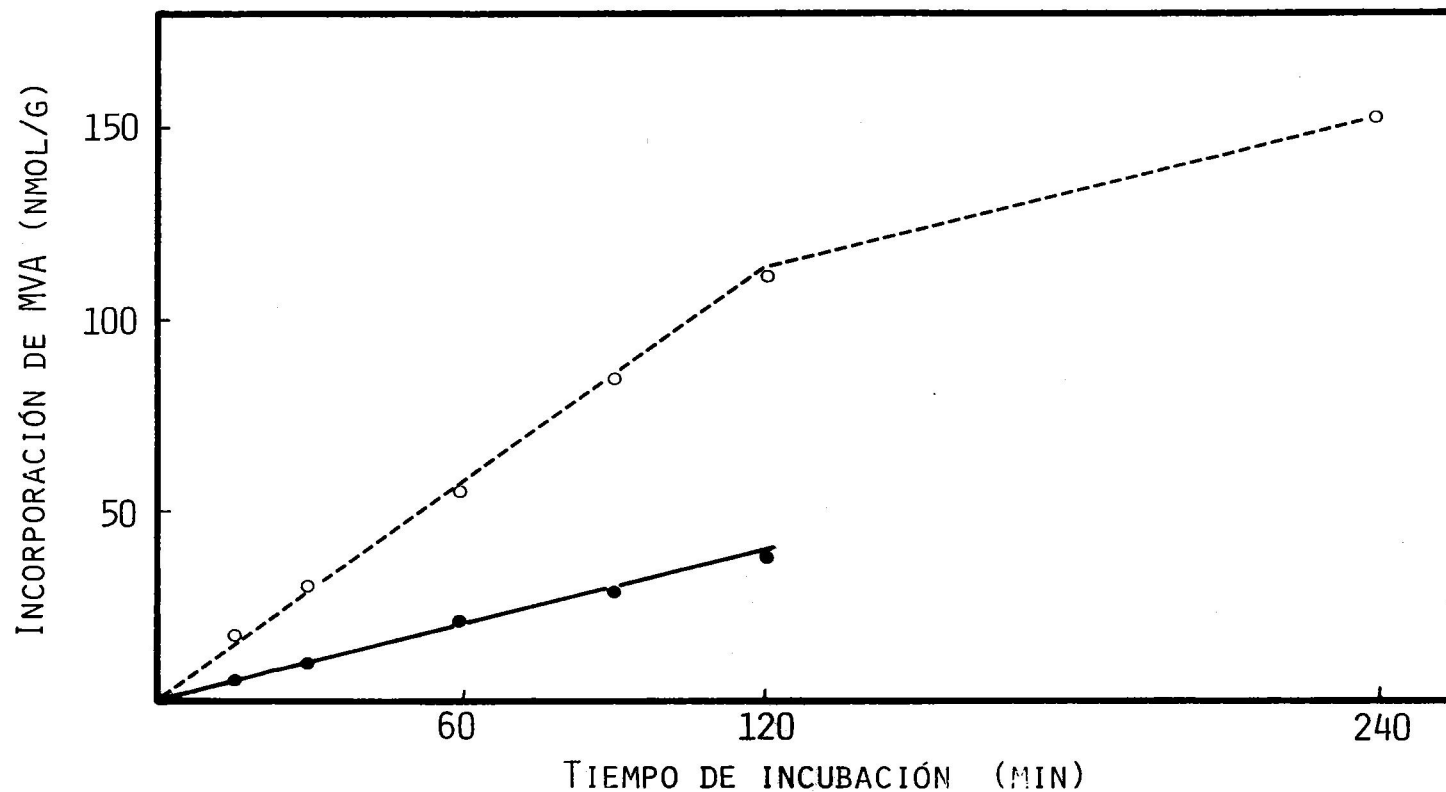


Figura 9 . Influencia del tiempo de incubación sobre la producción a partir de MVA de lípidos insaponificables por cortes de hígado y de riñón. Los resultados son la media de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos no excedió nunca el 20%. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de MVA 0.04 mM con cortes de hígado ( ●—● ) y 0.2 mM con cortes de riñón ( ○- - -○ ).

Tabla 14. Porcentajes relativos de diversos insaponificables formados a partir de MVA por cortes de hígado y de riñón al cabo de diversos tiempos de incubación

Tiempo de incubación	HIGADO				RIÑONES				
	E	L	U+P	C	E	U	L	P	C
15	9	12	37	42	17	24	22	19	18
30	7	7	51	35	29	19	18	20	14
60	10	6	39	45	6	3	13	57	20
90	-	-	-	-	2	3	5	72	19
120	2	4	32	62	4	4	7	67	18

El fraccionamiento de los lípidos insaponificables se realizó por cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974). Los datos corresponden a la radiactividad encontrada en compuestos que migran como: E=escualeno; U=ubiquinona-10; L=lanosterol; P=lípidos insaponificables polares; C=colesterol. Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 30%.

La producción renal de  $^{14}\text{CO}_2$  por la ruta cetogénica (como ocurriera antes, la actividad hepática calculada con el uso de (2- $^{14}\text{C}$ )MVA fue casi indetectable) siguió en cambio una dinámica acelerada (tabla 15): la velocidad de su desprendimiento se fue haciendo progresivamente mayor. Hasta tal punto que si a los 15 min suponía un 1% del total de  $\text{CO}_2$  e insaponificables marcados, a las 4 h representaba el 31%. Resulta atractivo pensar que la causa sea el progresivo acúmulo del hipotético intermediario de la ruta cetogénica cuyo metabolismo tiene una cinética sigmoïdal -a tenor de lo visto en el apartado anterior-. Al aumentar su concentración a lo largo del tiempo, la velocidad de la reacción de la que es sustrato se haría mucho mayor.

Es posible que contribuya a tal apariencia acelerada el catabolismo de los ácidos grasos sintetizados a partir del propio acetil-CoA procedente de la ruta cetogénica, o bien una rápida saturación de esta síntesis. Sugiere esta posibilidad la apariencia decelerada del acúmulo de fracción saponificable, y el que la suma del  $\text{CO}_2$  y de la fracción saponificable siga un curso casi lineal (tabla 15).

Para los siguientes estudios, elegimos el tiempo de incubación de 120 min, y una concentración 0.2 mM de (RS)MVA. Esta es lo suficientemente alta para que no se diluya apreciablemente la actividad específica del sustrato por el MVA celular -lo que podría dificultar la interpretación de los resultados-, pero dentro de la zona de cinética de primer orden.

Tabla 15. Influencia del tiempo de incubación sobre la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  y lípidos saponificables marcados a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA (por la ruta cetogénica) en cortes de riñón de pollos de 9 días

Tiempo de incubación	Producción de $\text{CO}_2$ (nmol/g)	% relativo inc. a $\text{CO}_2$	LS (nmol/g)	$\text{CO}_2$ +LS (nmol/g)
15	0.20	1	6.9	7.10
30	2.09	6	9.4	11.49
60	8.16	13	11.6	19.76
90	18.01	18	15.6	33.61
120	31.17	22	16.1	47.27
240	67.27	31	23.1	90.37

Los resultados son valores medios de los obtenidos en dos experimentos. La diferencia entre ambos valores fue siempre inferior al 15%. El % relativo de radiactividad incorporada a  $\text{CO}_2$  se calculó así: radiact. en  $\text{CO}_2$  / (radiact. en  $\text{CO}_2$  + radiact. en líp. insaponif.). LS= lípidos saponificables.

## II. CONTROL DEL METABOLISMO DEL MEVALONATO POR LA RUTA DE ESTEROLES Y POR LA RUTA CETOGENICA.

### 1. Estudio de la evolución postnatal del contenido en colesterol: efecto de una dieta con un 2% de colesterol.

#### 1.1. En el hígado.

Los niveles de colesterol en el hígado de los pollos alimentados con una dieta estándar (tabla 16) sufren una caída drástica a lo largo de los 4 primeros días posteriores a la eclosión, caída que, más suave, persiste hasta los 10 días. El descenso corresponde casi exclusivamente a la forma esterificada del colesterol (figura 10), que pasa de suponer un 91% del total tras la eclosión a sólo un 10-15% en los pollos de 10-15 días. Resultados similares obtuvieron Gómez Capilla y col. (1975). En los pollos adultos, según Deuel (1955), el colesterol esterificado hepático representa un 7% del total.

Parece claro, después de diversas investigaciones (Tsuji y col. 1955, Moore y Doran 1962, Schjeide y col. 1963, Noble y Moore 1964, Connor y col. 1969, Marco y col. 1983), que el colesterol almacenado en lipoproteínas -procedentes de las VLDL de la madre (Burley y col. 1984)- de la yema del huevo (Cook 1968) es esterificado y transportado -mediante lipoproteínas- durante el desarrollo embrionario hasta el hígado, donde se almacena de forma esterificada (sobre todo como colesteril oleato), y desde donde es convenientemente distribuido.

El agotamiento de la mayor parte del reservorio de colesterol del hígado y del saco vitelino -que involuciona durante la primera semana de vida postnatal (Karg y Schams 1966)- se

Tabla 16. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol total en el hígado de los pollos

Edad (días)	mg col./g tej.			mg en hígado		
	Controles	+2% col.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	52.19 <sup>±</sup> 3.58	51.23 <sup>±</sup> 6.92	0.91	64.65 <sup>±</sup> 4.07	55.94 <sup>±</sup> 6.66	0.33
4	14.90 <sup>±</sup> 1.47	14.57 <sup>±</sup> 2.08	0.91	26.11 <sup>±</sup> 2.25	25.65 <sup>±</sup> 2.27	0.90
7	5.74 <sup>±</sup> 0.73	9.63 <sup>±</sup> 0.72	0.02	12.28 <sup>±</sup> 1.85	23.39 <sup>±</sup> 3.54	0.05
10	2.98 <sup>±</sup> 0.31	6.05 <sup>±</sup> 0.07	0.011	7.65 <sup>±</sup> 1.34	18.50 <sup>±</sup> 1.35	0.005
15	2.91 <sup>±</sup> 0.03	9.68 <sup>±</sup> 0.88	0.02	12.86 <sup>±</sup> 0.84	36.08 <sup>±</sup> 3.02	0.002

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

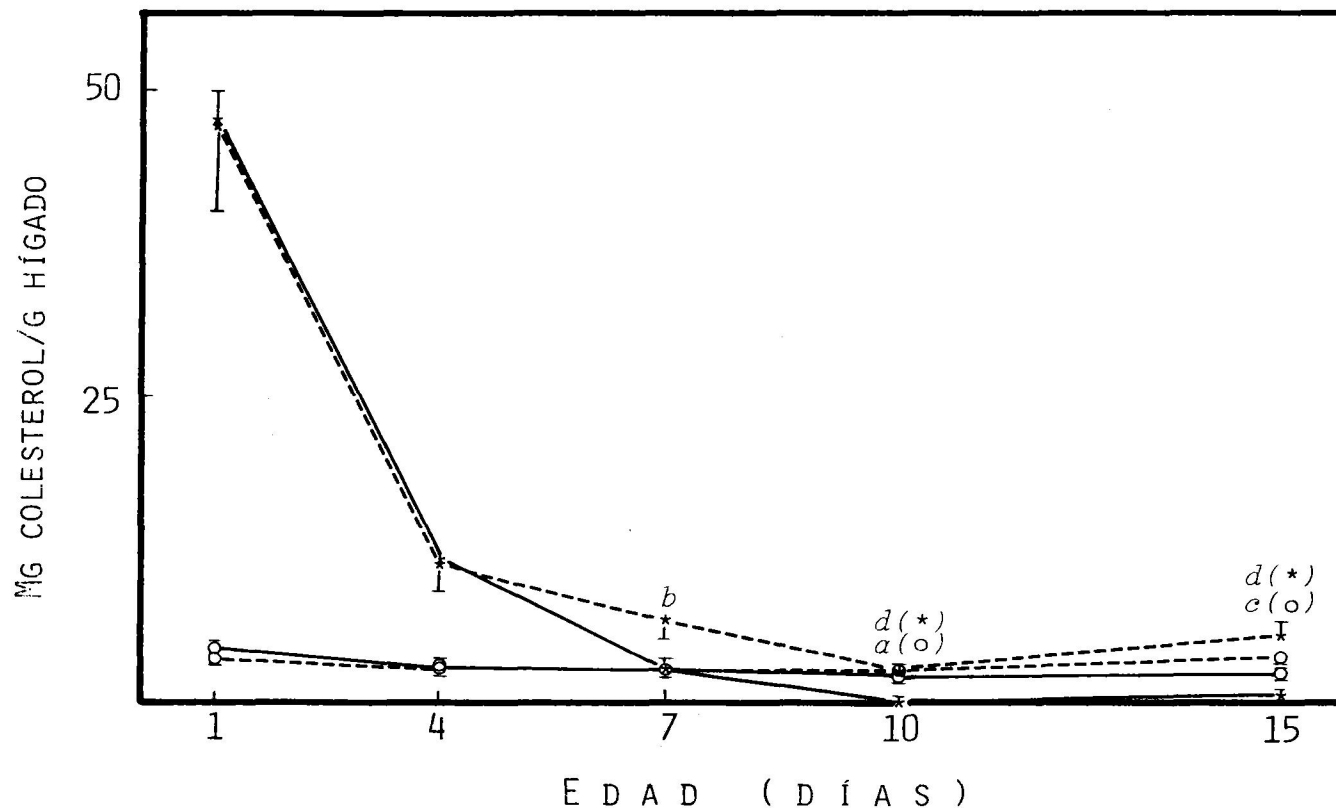


Figura 10. Efecto de la ingesta de colesterol sobre el contenido de colesterol libre y esterificado en hígado a lo largo del desarrollo postnatal. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos. ( \*—\* ) col. esterif. controles; ( \*- - -\* ) col. esterif. +2% col.; ( o—o ) col. libre controles; ( o- - -o ) col. libre +2% col. Significación de las diferencias entre controles y tratados: *a*,  $p < 0.1$ ; *b*,  $p < 0.05$ ; *c*,  $p < 0.02$ ; *d*,  $p < 0.0005$ . Entre controles de 1 y 4 días,  $p < 0.04$ .



entiende por la gran demanda que supone la formación de membranas en un período de crecimiento activo (Siperstein 1984) del pollo.

La dieta con un 2% de colesterol se manifiesta a partir de los 7 días como un gran incremento sobre todo del colesterol esterificado (tabla 17, figura 10), que hace que el hígado tome un aspecto graso. De nuevo se manifiesta esta forma de colesterol como un reservorio. Un incremento del contenido hepático de colesterol, generalmente rápido, tras la ingesta de colesterol ya se ha visto en el pollo adulto (Ho 1976) y en diversos mamíferos. En la rata (Mathé y Chevallier 1979, Takeuchi y col. 1976, Bochenek y Rodgers 1978, Turley y Dietschy 1979), en el cobaya (Green y col. 1976, Drevon y Hovig 1977), en el gerbil (Andersen y Holub 1982) y en el hamster (Ho 1975), el aumento también se debe casi exclusivamente al colesterol esterificado. En la rata se altera además la composición de ácidos grasos de los ésteres de colesterol (Morris y Ross 1973). En general, una mayor entrada de colesterol al hígado o una menor utilización de colesterol para la síntesis de lipoproteínas o de ácidos biliares se asocia, además de con la inhibición de la colesterologénesis, con un crecimiento del almacén de colesterol esterificado mediado por una activación de la acil-CoA:colesterol acil transferasa (Nervi y col. 1975, Weis y Dietschy 1975, Carrella y Dietschy 1977, Nervi y Dietschy 1978, Andersen y col. 1979, Turley y Dietschy 1979).

La esterificación de colesterol en el tejido hepático por la acil-CoA:colesterol aciltransferasa de cobayas alimentados con una dieta rica en grasas y colesterol (Drevon 1978) o en colesterol (Heller 1983) aumenta fuertemente en comparación con los controles, mientras que la hidrólisis de ésteres de colesterol no

Tabla 17. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol total en los riñones de los pollos

Edad (días)	mg col./g tej.			mg en riñones		
	Controles	+2% col.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	3.75 <sup>±</sup> 0.11	4.20 <sup>±</sup> 0.82	0.65	1.15 <sup>±</sup> 0.05	1.22 <sup>±</sup> 0.21	0.77
4	4.61 <sup>±</sup> 0.17	5.16 <sup>±</sup> 1.00	0.65	2.21 <sup>±</sup> 0.15	2.42 <sup>±</sup> 0.27	0.54
7	4.64 <sup>±</sup> 0.14	4.70 <sup>±</sup> 0.19	0.82	2.38 <sup>±</sup> 0.02	2.58 <sup>±</sup> 0.07	0.052
10	5.92 <sup>±</sup> 0.21	6.47 <sup>±</sup> 0.27	0.19	4.52 <sup>±</sup> 0.36	5.73 <sup>±</sup> 0.59	0.16
15	4.58 <sup>±</sup> 0.18	5.40 <sup>±</sup> 0.20	0.038	6.32 <sup>±</sup> 0.15	6.65 <sup>±</sup> 1.04	0.79

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

cambia. Este hecho da cuenta del gran acúmulo de colesterol esterificado en el hígado<sup>1</sup>.

Puede ser importante para el organismo la regulación de la cantidad de colesterol libre en todo tipo de membranas, en orden a prevenir grandes alteraciones de sus funciones. El gran acúmulo de colesterol esterificado en el hígado puede contemplarse como una forma razonable de manejar la enorme cantidad de colesterol almacenada -eventualmente- en el cuerpo.

Otra respuesta fisiológica a la ingesta de colesterol parece ser una mayor producción de ácidos biliares, como se ha observado en la rata (Mathé y Chevallier 1980, Lefevre y col. 1972, Hansma y Ostwald 1974) y en el pollo (Sklan y Budowski 1979). Según otros autores (Turley y Dietschy 1979), la dieta de colesterol (2%) no afecta en la rata ni a la producción de ácidos biliares ni

<sup>1</sup> En principio, el colesterol puede aumentar la actividad acil-CoA: colesterol aciltransferasa por alguno de al menos tres mecanismos (Chang y Doolittle 1983). En primer lugar, puede proporcionar simplemente más sustrato. Además del sitio catalítico para el colesterol, la enzima puede contener un sitio activador alostérico que reconoce al colesterol o un análogo. En tercer lugar, puede tratarse de una modificación covalente inducida por el colesterol. Brown y col. (1975) hallaron que análogos oxigenados del colesterol estimulaban la citada actividad de fibroblastos humanos, demostrando un mecanismo específico de activación por esteroides. Otros autores (Lichtenstein y Brechter 1980, Erickson y col. 1980) mostraron una activación del 100% en la actividad transferasa por efecto del 25-hidroxicolesterol. Sin embargo, el mecanismo molecular de activación se desconoce por el momento. Cabe la posibilidad de que, como se ha sugerido para la reductasa (Ide y col. 1979), sea sólo un determinado "compartimento" del colesterol, y no sus niveles totales, el que actúe como activador de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa.

a la excreción de colesterol en la bilis. Nosotros no hemos medido estos parámetros pero los pollos que ingerían colesterol mostraban un gran aumento del contenido de la vesícula biliar.

#### 1. 2. En los riñones.

En los riñones (tabla 17), los niveles de colesterol por peso de tejido aumentan tras la eclosión hasta los 10 días. En particular se eleva el colesterol libre mientras desciende -mucho menos- el esterificado (entre 7 y 10 días) (tabla 18).

La dieta rica en colesterol provoca un aumento poco significativo en el contenido de colesterol libre pero que sí lo es (significativo) en el contenido de colesterol esterificado (tabla 18), al igual que observaron Drevon y Hovig (1977) en cobayas adultos. Ho también observó que el colesterol dietario (2%) producía un aumento ligero, pero significativo, del nivel de colesterol total en los riñones de pollos adultos (Ho 1976) y de hamsters (Ho 1975).

Llama la atención que este efecto sobre los riñones de la ingesta de colesterol no se corresponda con unos niveles de colesterol altos en los pollos recién nacidos, que han tenido -y tienen- un suministro de colesterol riquísimo, procedente del saco vitelino. El diferente efecto de ambas fuentes de colesterol puede deberse al modo de acceso de éste, ya que el del saco vitelino no llega al pollo vía intestino delgado, y el de la dieta sí (Fritz 1961); este último, gracias al sistema porta-renal de estos animales (Spanner 1924/25, Bulger y Trump 1968, Purton 1970, Siller 1971, Akester 1971), puede tener un acceso más directo al riñón.

Tabla 18. Efecto de la ingesta de colesterol sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado en los riñones de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				'mg/g' p<	Colesterol esterificado (mg/g tej.)		
	Controles		+2% col.			Controles	+2% col.	p<
	% relat.	mg/g tej.	% relat.	mg/g tej.				
1	84.2 <sup>±</sup> 3.0	3.15 <sup>±</sup> 0.11	82.7 <sup>±</sup> 1.5	3.45 <sup>±</sup> 0.65	0.70	0.60 <sup>±</sup> 0.12	0.75 <sup>±</sup> 0.20	0.56
4	85.8 <sup>±</sup> 0.2	3.95 <sup>±</sup> 0.14	87.2 <sup>±</sup> 0.8	4.48 <sup>±</sup> 0.83	0.60	0.66 <sup>±</sup> 0.03	0.67 <sup>±</sup> 0.16	0.96
7	85.0 <sup>±</sup> 0.9	3.94 <sup>±</sup> 0.08	86.8 <sup>±</sup> 3.2	4.07 <sup>±</sup> 0.10	0.37	0.70 <sup>±</sup> 0.06	0.63 <sup>±</sup> 0.18	0.74
10	96.4 <sup>±</sup> 0.3	5.70 <sup>±</sup> 0.19	92.9 <sup>±</sup> 2.3	6.00 <sup>±</sup> 0.17	0.31	0.22 <sup>±</sup> 0.02	0.47 <sup>±</sup> 0.07	0.026
15	94.4 <sup>±</sup> 1.2	4.32 <sup>±</sup> 0.21	90.6 <sup>±</sup> 0.7	4.89 <sup>±</sup> 0.17	0.11	0.26 <sup>±</sup> 0.07	0.51 <sup>±</sup> 0.05	0.044

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

### 1.3. En el encéfalo.

El nivel de colesterol en el encéfalo (tablas 19 y 20) aumenta proporcionalmente al peso del órgano, a razón de 1 mg colesterol/ 100 mg encéfalo fresco. Cabe esperar, puesto que al parecer el pollo nace prácticamente mielinizado. Esto último concuerda con el hecho de que en los pollos recién nacidos casi todo el colesterol encefálico sea no-esterificado, (tabla 20), ya que el colesterol esterificado (y el desmosterol) son abundantes en el cerebro en desarrollo, pero disminuyen conforme avanza la mielinización (Davison 1965, Adams y Davison 1959).

Si se comparan los datos del pollo con los observados en diversos mamíferos (Ho y Taylor 1968), se concluye que los niveles de colesterol en distintos tejidos son semejantes, salvo en el caso del encéfalo, que muestra en el pollo valores unas tres veces más bajos, probablemente debido a alguna diferencia estructural (Ho 1976).

La dieta alta en colesterol no afecta en absoluto al contenido encefálico de colesterol (tablas 19 y 20), como ya observara Ho (1976) en el cerebro de pollos adultos. La resistencia del tejido encefálico a la deposición del exceso de colesterol ingerido quizá se deba a la barrera hematoencefálica, que bloquea el paso de colesterol desde el sistema vascular al parénquima encefálico (Chobanian y Hollander 1962) y al lento recambio de colesterol estructural en el cerebro maduro (Sreene y col. 1950).

Tabla 19. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol total en el encéfalo de los pollos

Edad (días)	mg col./g tej.			mg en cerebro		
	Controles	+2% col.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	9.14 $\pm$ 0.30	9.90 $\pm$ 0.52	0.28	8.73 $\pm$ 0.04	9.22 $\pm$ 0.90	0.65
4	10.66 $\pm$ 0.24	10.14 $\pm$ 0.61	0.48	12.23 $\pm$ 0.30	12.21 $\pm$ 0.99	0.99
7	10.23 $\pm$ 1.08	11.22 $\pm$ 0.29	0.43	13.51 $\pm$ 1.68	14.15 $\pm$ 0.27	0.75
10	12.90 $\pm$ 0.54	12.07 $\pm$ 1.11	0.54	16.94 $\pm$ 0.66	15.84 $\pm$ 1.88	0.62
15	9.77 $\pm$ 0.42	9.56 $\pm$ 0.75	0.82	16.91 $\pm$ 0.59	15.62 $\pm$ 0.91	0.31

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

Tabla 20. Efecto de la ingesta de colesterol sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado en el encéfalo de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				Colesterol esterificado			
	Controles		+2% col.		'mg/g'	(mg/g tej.)		p<
	% relat.	mg/g tej.	% relat.	mg/g tej.		Controles	+2% col.	
1	99.5 $\pm$ 0.5	9.10 $\pm$ 0.26	98.7 $\pm$ 1.3	9.77 $\pm$ 0.53	0.32	0.05 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.13	0.58
4	96.6 $\pm$ 0.5	10.29 $\pm$ 0.28	96.2 $\pm$ 0.3	9.76 $\pm$ 0.61	0.48	0.37 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.01	0.79
7	96.6 $\pm$ 0.5	9.88 $\pm$ 1.04	95.9 $\pm$ 0.4	10.76 $\pm$ 0.30	0.47	0.35 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.03	0.18
10	96.2 $\pm$ 0.4	12.41 $\pm$ 0.52	96.8 $\pm$ 1.0	11.69 $\pm$ 1.13	0.60	0.49 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.02	0.16
15	94.0 $\pm$ 0.9	9.18 $\pm$ 0.40	95.1 $\pm$ 0.5	9.08 $\pm$ 0.67	0.91	0.59 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.08	0.41

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.



#### 1.4. En el suero.

El sistema de transporte lipídico de las aves ha recibido gran atención desde hace bastante tiempo. Ello es debido a la utilización de algunas especies -sobre todo el pollo- como animales modelos para el estudio de hiperlipidemias inducidas por estrógenos (Schjeide y Wilkens 1964, Florsheim y col. 1963) y de la hipercolesterolemia y aterosclerosis inducidas por la dieta (Chandler y col. 1979, Kahn y col. 1963).

Sin embargo, los pollos difieren de los mamíferos en el sistema de absorción. La grasa exógena en estos animales llega al torrente circulatorio vía sistema portal formando parte de grandes VLDL o "portomicrones", en vez de en quilomicrones vía sistema linfático (Noyan y col. 1964, Bensadoun y Rothfeld 1972), como ocurre típicamente en mamíferos (Senior 1964).

Los niveles séricos de colesterol, tanto libre como esterificado (tablas 21 y 22) caen fuertemente (casi un 50%) entre los días 4 y 9 de vida postnatal del pollo. La proporción de colesterol libre siempre ronda el 32%, frente al 36% encontrado en pollos adultos por otros autores (Teekell y col. 1975).

El colesterol asociado a las HDL (tablas 23 y 24), un índice de la inocuidad aterogénica del colesterol circulante en mamíferos (Gordon y col. 1977, Williams y col. 1979, Heiss y col. 1980), posiblemente por transportar colesterol (procedente de otras lipoproteínas o de tejidos periféricos) al hígado para su catabolismo (Miller y Miller 1975, Mahley 1982), anduvo siempre en torno al 70%. A medida que se desarrollaban los pollos, estas lipoproteínas se fueron enriqueciendo paulatinamente en colesterol libre (tabla

Tabla 21 . Efecto de la adición de un 2% de co-  
lesterol a la dieta sobre el contenido de coles-  
terol total en el suero de los pollos

Edad (días)	mg col./100 ml suero		p<
	Controles	+2% colest.	
1	358 <sup>+</sup> 4	-----	-----
4	321 <sup>+</sup> 18	322 <sup>+</sup> 26	0.98
9	177 <sup>+</sup> 11	197 <sup>+</sup> 22	0.45
15	182 <sup>+</sup> 7	268 <sup>+</sup> 34	0.048
23	169 <sup>+</sup> 14	388 <sup>+</sup> 29	0.0019
33	208 <sup>+</sup> 16	622 <sup>+</sup> 47	0.0008

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1, 23 y 33 días, y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

Tabla 22. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado en el suero de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				Colesterol esterificado			
	Controles		+2% col.		'mg/g' p<	(mg/ 100 ml)		p<
	% relat.	mg/100 ml	% relat.	mg/100 ml		Controles	+2% col.	
1	31.6	113 <sup>±</sup> 5	---	-----	---	246 <sup>±</sup> 9	-----	---
4	31.8	102 <sup>±</sup> 11	36.2	117 <sup>±</sup> 10	0.38	219 <sup>±</sup> 8	206 <sup>±</sup> 17	0.50
9	32.0	57 <sup>±</sup> 2	32.8	65 <sup>±</sup> 7	0.32	120 <sup>±</sup> 9	133 <sup>±</sup> 14	0.50
15	31.4	57 <sup>±</sup> 2	29.3	79 <sup>±</sup> 10	0.08	125 <sup>±</sup> 5	189 <sup>±</sup> 25	0.046
23	33.2	56 <sup>±</sup> 4	31.0	120 <sup>±</sup> 12	0.0072	113 <sup>±</sup> 12	267 <sup>±</sup> 18	0.0013
33	22.6	47 <sup>±</sup> 5	27.2	169 <sup>±</sup> 4	0.00001	161 <sup>±</sup> 12	453 <sup>±</sup> 48	0.0096

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1, 23 y 33 días, y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

Tabla 23. Efecto de la ingesta de colesterol sobre los niveles de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a lo largo del desarrollo postnatal del pollo

Edad (días)	mg col.--HDL/100 ml suero		p<
	Controles	+2% colest.	
1	244 <sup>±</sup> 6	-----	---
4	196 <sup>±</sup> 16	175 <sup>±</sup> 11	0.37
9	136 <sup>±</sup> 7	119 <sup>±</sup> 8	0.13
15	119 <sup>±</sup> 6	122 <sup>±</sup> 4	0.70
23	126 <sup>±</sup> 4	102 <sup>±</sup> 8	0.063

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días, y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

Tabla 24. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				Colesterol esterificado			
	Controles		+2% col.		'mg/g'	(mg / 100 ml)		p<
	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml		Controles	+2% col.	
1	33.2	81 <sup>+5</sup>	----	----	---	164 <sup>+4</sup>	----	---
4	37.2	73 <sup>+8</sup>	44.8	79 <sup>+3</sup>	0.57	123 <sup>+8</sup>	97 <sup>+12</sup>	0.12
9	38.9	53 <sup>+1</sup>	44.0	52 <sup>+3</sup>	0.77	83 <sup>+8</sup>	67 <sup>+6</sup>	0.16
15	40.8	49 <sup>+1</sup>	41.8	51 <sup>+1</sup>	0.21	71 <sup>+6</sup>	71 <sup>+4</sup>	0.97
23	41.5	52 <sup>+0.2</sup>	42.2	43 <sup>+3</sup>	0.059	74 <sup>+5</sup>	59 <sup>+6</sup>	0.13

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

24). Seguramente se debe a que en los pollos de más edad es mayor la proporción de partículas de HDL de menor tamaño (con un núcleo de colesterol esterificado menos voluminoso), por disminuir el aporte de colesterol libre de las otras lipoproteínas (tablas 25 y 26) y su consiguiente esterificación por la lecitina:colesterol aciltransferasa sérica (Eisenberg 1983). A su vez, la caída en el colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (tablas 25 y 26) es fácilmente comprensible, pues el hígado exporta colesterol integrado en partículas de VLDL (Eisenberg y Levy 1975) y -como ya hemos visto- el almacén hepático de colesterol casi se agota durante los primeros días tras la eclosión.

Las variaciones postnatales del colesterol total sérico que hemos observado son muy similares a las descritas por Connor y col. (1969). Rodbard y col. (1951) también reseñaron altos niveles de colesterol total en el suero de los pollos recién nacidos. Nuestros valores de colesterol total en los pollos de más edad son parecidos asimismo a los encontrados en pollos hembras de las razas Leghorn blanca y broiler, de 8 y 4 semanas de edad, respectivamente (Qureshi y col. 1983), si bien nosotros observamos una mayor proporción (en torno al 70%) ligada a las HDL. Sí se ha encontrado, como en nuestro caso, más colesterol en HDL que en el conjunto del resto de lipoproteínas en pollos New Hampshire Columbian de 4 y de 8 semanas (Kruski y Narayan 1972).

Las variaciones que tienen lugar en el pollo se corresponden como cabía esperar (por la influencia de la dieta) con un aumento del colesterol sérico durante la lactancia y su posterior descenso tras el destete en diversos mamíferos: becerros, corderos,

Tabla 25 . Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol total en las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL + VLDL) y sobre la relación entre éste y el colesterol asociado a las de alta densidad (HDL) a lo largo del desarrollo postnatal del pollo

Edad (días)	mg col(LDL+VLDL)/100ml suero			col(LDL-VLDL)/col(HDL)		
	Controles	+2% colest.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	117 <sup>±</sup> 10	-----	-----	0.49 <sup>±</sup> 0.06	-----	-----
4	125 <sup>±</sup> 19	148 <sup>±</sup> 30	0.54	0.63 <sup>±</sup> 0.13	0.86 <sup>±</sup> 0.21	0.44
9	42 <sup>±</sup> 11	78 <sup>±</sup> 13	0.071	0.32 <sup>±</sup> 0.10	0.65 <sup>±</sup> 0.08	0.033
15	63 <sup>±</sup> 5	144 <sup>±</sup> 33	0.050	0.53 <sup>±</sup> 0.06	1.15 <sup>±</sup> 0.25	0.054
23	43 <sup>±</sup> 10	286 <sup>±</sup> 39	0.009	0.33 <sup>±</sup> 0.06	3.04 <sup>±</sup> 0.79	0.043

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

Tabla 26. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL a VLDL) de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				Colesterol esterificado			
	Controles		+2% col.		'mg/g'	(mg/100 ml)		p<
	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml		Controles	+2% col.	
1	29.9	35 <sup>±</sup> 4	----	----	---	82 <sup>±</sup> 8	----	---
4	23.2	29 <sup>±</sup> 13	25.7	38 <sup>±</sup> 12	0.65	96 <sup>±</sup> 7	109 <sup>±</sup> 18	0.47
9	9.5	4 <sup>±</sup> 1	16.7	13 <sup>±</sup> 6	0.097	35 <sup>±</sup> 11	65 <sup>±</sup> 10	0.093
15	12.7	8 <sup>±</sup> 1	19.4	28 <sup>±</sup> 10	0.12	54 <sup>±</sup> 6	118 <sup>±</sup> 26	0.052
23	11.6	5 <sup>±</sup> 3	26.9	77 <sup>±</sup> 16	0.020	38 <sup>±</sup> 9	209 <sup>±</sup> 24	0.0021

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.



Tabla 25. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol total en las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL+VLDL) y sobre la relación entre éste y el colesterol asociado a las de alta densidad (HDL) a lo largo del desarrollo postnatal del pollo

Edad (días)	mg col(LDL+VLDL)/100ml suero			col(LDL-VLDL)/col(HDL)		
	Controles	+2% colest.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	117 <sup>±</sup> 10	-----	-----	0.49 <sup>±</sup> 0.06	-----	-----
4	125 <sup>±</sup> 19	148 <sup>±</sup> 30	0.54	0.63 <sup>±</sup> 0.13	0.86 <sup>±</sup> 0.21	0.44
9	42 <sup>±</sup> 11	78 <sup>±</sup> 13	0.071	0.32 <sup>±</sup> 0.10	0.65 <sup>±</sup> 0.08	0.033
15	63 <sup>±</sup> 5	144 <sup>±</sup> 33	0.050	0.53 <sup>±</sup> 0.06	1.15 <sup>±</sup> 0.25	0.054
23	43 <sup>±</sup> 10	286 <sup>±</sup> 39	0.009	0.33 <sup>±</sup> 0.06	3.04 <sup>±</sup> 0.79	0.043

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

Tabla 26. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre el contenido de colesterol libre y de colesterol esterificado de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL a VLDL) de los pollos a lo largo de su desarrollo postnatal

Edad (días)	Colesterol libre				Colesterol esterificado			
	Controles		+2% col.		'mg/g'	(mg/100 ml)		p<
	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml	% relat. mg/100 ml		Controles	+2% col.	
1	29.9	35 <sup>±</sup> 4	-----	-----	---	82 <sup>±</sup> 8	-----	---
4	23.2	29 <sup>±</sup> 13	25.7	38 <sup>±</sup> 12	0.65	96 <sup>±</sup> 7	109 <sup>±</sup> 18	0.47
9	9.5	4 <sup>±</sup> 1	16.7	13 <sup>±</sup> 6	0.097	35 <sup>±</sup> 11	65 <sup>±</sup> 10	0.093
15	12.7	8 <sup>±</sup> 1	19.4	28 <sup>±</sup> 10	0.12	54 <sup>±</sup> 6	118 <sup>±</sup> 26	0.052
23	11.6	5 <sup>±</sup> 3	26.9	77 <sup>±</sup> 16	0.020	38 <sup>±</sup> 9	209 <sup>±</sup> 24	0.0021

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos, salvo en los valores controles de 1 y 23 días y en los tratados de 4 días, en que los experimentos fueron tres.

cerdos, potros (Carroll y Hamilton 1973), ratas (Naseem y col. 1980, Harris y col. 1966), conejos (Friedman y Byers 1961, Roberts y col. 1979), gatos y cobayas (Hamilton y Carroll 1977).

En los humanos también aumenta el colesterol plasmático durante la lactancia (Ginsburg y Zettertröm 1980, Persson y Gentz 1966, Andersen y Friis-Hansen 1977), pero permanece alto tras el destete (Friedman y Goldberg 1973, Kwiterovich 1977). Como resultado, los humanos tenemos unos niveles de colesterol plasmático mayores que otras especies (Carroll y Huff 1977, Kritchevsky 1958). La hipercolesterolemia del período lactante probablemente se deba al alto contenido en grasas y colesterol de la leche (Carroll y col. 1978, Friedman y Byers 1961), de forma similar a como la hipercolesterolemia neonatal de los pollos es debida al contenido lipídico del saco vitelino. La depleción del colesterol plasmático que conllevan el destete de los mamíferos y la eclosión del pollo se explican por el agotamiento de ese suministro lipídico.

En el caso de los mamíferos quizá influya también la transición de la ingesta de proteínas lácteas a proteínas vegetales (Roberts y col. 1979), pues es sabido que las proteínas de origen animal, incluyendo la caseína, pueden originar hipercolesterolemia en animales diversos como los conejos (Kritchevsky y col. 1978, Huff y col. 1977), las ratas (Yadav y Liener 1977), los cerdos (Kim y col. 1978) y, al parecer, los humanos (Sirtori y col. 1977, Carroll y col. 1978) -aunque en estos hay controversia (Raaij y col. 1981). En los pollos, están por estudiar los posibles efectos de las proteínas del saco vitelino. Por el momento no está siquiera claro el influjo de otros tipos de proteína (Hevia y col. 1979, Her-

mus 1978, Raaij y col. 1979).

La dieta con un 2% de colesterol empezó a mostrar efecto a los 9 días, de forma que a los 15 ya indujo un aumento de casi el 50% en el colesterol total, que fue del 100% (aproximadamente) a los 23 días (tabla 21), todo ello sin afectar a la relación libre/esterificado (tabla 22).

Nuestros datos sobre colesterol total son semejantes a los obtenidos en pollos hembras de raza broilers (Keeley 1979) y en pollos de raza Leghorn blanca (Chvapil y col. 1976) cuando se les añadió tras la eclosión un 2% de colesterol en la dieta. La respuesta temporal y la magnitud de la hipercolesterolemia inducida están asimismo de acuerdo con varias investigaciones en pollos alimentados con dietas y por periodos de tiempo similares; en estos estudios, cuando la dieta rica en colesterol se prolonga, aparecen lesiones en la aorta a las 10-12 semanas de su inicio (Rodbard y col. 1951, Peterson y col. 1952, Kahn y col. 1963, Sturkie 1965, Rucker y col. 1975).

Pero el cambio más llamativo provocado por el colesterol dietario es que el colesterol ligado a las HDL no sólo no aumenta sino que incluso desciende ligeramente (sin modificarse la relación libre/esterificado), mientras que el asociado al conjunto de IDL, LDL y VLDL se eleva intensamente (tablas 23, 24, 25 y 26). Tal aumento selectivo ya se había puesto de manifiesto anteriormente en pollos de 7 semanas (Mol y col. 1982, Terpstra y Beynen 1984). En estos estudios aumentó específicamente el colesterol de las IDL y de las VLDL, disminuyó el de las LDL y no se afectó el de las HDL.

Resultados similares a los nuestros se han obtenido en conejos (Lacombe y col. 1983), perros de las praderas (Chenou-da 1984) y titfs comunes (McIntosh y col. 1984). En las ratas, aunque el colesterol de la dieta no eleva el colesterol total plasmático, se incrementan los niveles del ligado a LDL y disminuyen los del ligado a HDL (Narayan 1971). En los primates no humanos aumentan los niveles de colesterol en el conjunto de LDL y VLDL (McGill y col. 1981, Srinivasan y col. 1979), mientras que el colesterol de las HDL aumenta en unas especies (Srinivasan y col. 1979) y disminuye en otras (Mahley y col. 1976, Rudel y col. 1979).

En el hombre, los estudios realizados son menos rigurosos. Parece ser que la dieta rica en colesterol provoca un aumento generalmente pequeño de los niveles séricos (Beveridge y col. 1960, Connor y col. 1961, Mattson y col. 1972, Hegsted y col. 1965, Connor y col. 1965, Chenoweth y col. 1981, Applebaum-Bowden y col. 1984), aunque otros estudios (generalmente, en experimentos menos controlados) no encuentran ninguna variación por la presencia o ausencia de uno o dos huevos en la dieta (Slater y col. 1976, Porter y col. 1977, Flynn y col. 1979)<sup>1</sup>. Se han hecho aún pocas indagaciones sobre el Índice 'colesterol(LDL)/colesterol (HDL)' -o similar-. Según Chenoweth y col. (1981) no se afecta por la adición de dos huevos diarios a la dieta, pero por los datos de Applebaum-Bowden y col. (1984) parece que aumenta.

<sup>1</sup> Según algunos autores (Schonfeld y col. 1982), sólo cuando la relación 'ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados' en la dieta humana es baja, un incremento del colesterol dietario eleva significativamente los niveles de colesterol sérico.

Destaquemos de todo lo dicho, antes de entrar en el estudio del metabolismo del MVA, que, en el caso de los pollos recién nacidos, nos enfrentaremos a dos situaciones distintas que se manifiestan de diferente forma, aunque ambas conlleven altos niveles de colesterol circulante provocados por un elevado suministro -a través de vías distintas-. Por un lado la hipercolesterolemia inducida por la ingesta de colesterol, en la que se incrementa el transportado en lipoproteínas de baja densidad. Como acabamos de comprobar, esta situación del pollo es comparable a este respecto con la que tiene lugar en los mamíferos por una elevada ingestión de colesterol y, según Ginsburg y Zetterström (1980), como consecuencia de la lactación.

Pero la situación más particular la constituye la hipercolesterolemia perinatal del pollo, en la cual el colesterol se distribuye entre las lipoproteínas de alta y baja densidad sin alterar significativamente su relación. En otras palabras, el índice de peligrosidad aterogénica  $\text{col(LDL+VLDL)/col(HDL)}$  es muy inferior en este caso en relación con el anterior (tabla 25).

Como ya se apuntó antes, aunque el saco vitelino está conectado directamente con el duodeno, hay poco o ningún movimiento de material a través de esta senda -incluso tras la eclosión-. En lugar de eso, el saco vitelino es absorbido a través de su membrana y transportado al pollo por los vasos onfalomesentéricos (Fritz 1961). Las lipoproteínas en que se transporta el colesterol procedente del saco vitelino deben llevar las apoproteínas convenientes para ser reconocidas por receptores específicos de hígado -similares a los receptores de remanentes de quilomicrones de

los mamíferos, que se introducen en la célula por endocitosis tras la unión con estas lipoproteínas (Hui y col. 1981, Kita y col. 1982, Cooper y col. 1982, Brown y Goldstein 1983)-, ya que la casi totalidad de ese colesterol la capta y almacena el hígado y no otros tejidos. Quizá sean los mismos receptores hepáticos los que se unen a los remanentes de portomicrones tras la ingesta de colesterol, explicándose el leve acúmulo renal, como ya dijimos, por el gran flujo que le suministra el sistema porta-renal.

2. Estudios sobre el metabolismo del mevalonato por la ruta de esteroides "in vitro".

2. 1. Evolución postnatal de la incorporación de mevalonato por cortes de hígado y de riñón.

Es bien sabido (Siperstein y Fagan 1966, Leveille y col. 1960, Shefer y col. 1973) que un sistema de retrocontrol sobre la HMG-CoA reductasa hepática tiende a atenuar -junto con un aumento de la conversión de colesterol en ácidos biliares (Lefevre y col. 1972, Hansma y Ostwald 1974, O'Brien y col. 1977)- el aumento de los niveles de colesterol cuando éste se toma en la dieta.

Sin embargo, hay discrepancias acerca de la existencia de más puntos secundarios de regulación que respondan al colesterol y, más aún, sobre su importancia fisiológica. Además, no se conoce el efecto del incremento de la concentración de colesterol en el suero o en el hígado sobre la actividad de la ruta cetogénica del MVA, que nos podría dar indicios sobre su posible papel regulador.

Para esclarecer estos asuntos el pollo recién nacido es un modelo prometedor. ¿Cómo repercutirá el agotamiento del gran depósito de colesterol contenido en el saco vitelino y en el hígado en la colesterogénesis a partir del MVA y en la actividad de la ruta cetogénica?. La pregunta es más relevante si recordamos la gran similitud enzimática entre aves y mamíferos y que la eclosión del pollo y el destete de los mamíferos son análogos por cuanto que ambos representan el paso final hacia la independencia y una transición de un suministro nutritivo relativamente alto en



grasas (leche o saco vitelino, según el caso) a otro pobre en grasas y rico en glúcidos (Greengard y Thorndike 1974).

El estudio "in vitro" debe considerarse preliminar del que había de realizarse "in vivo". Es evidente que pretendemos conocer lo que acontece en el animal vivo, pero los resultados obtenidos mediante técnicas "in vitro" servirán de complemento y ayudarán con toda probabilidad a la interpretación de los datos obtenidos con el procedimiento de la inyección intraperitoneal.

La producción hepática de lípidos insaponificables a partir de MVA (figura 11) se multiplicó por 4 durante los 4 primeros días de vida "libre", y se estabilizó posteriormente. La cantidad relativa de cada uno de los insaponificables aislados que se forma a lo largo de la edad se muestra en la tabla 27. Discutiremos las variaciones junto con las observadas "in vivo".

Los cortes de riñón (figura 12) manifiestan un descenso significativo de actividad entre los días 1 y 7, seguido de un incremento hasta los niveles iniciales entre los 7 y los 10-17 días. Los principales cambios observados tras el fraccionamiento de los lípidos insaponificables (tabla 28) consistieron en un aumento de la producción de escualeno y un descenso de la síntesis de insaponificables polares.

## 2. 2. Efecto de una dieta rica (2%) en colesterol sobre el metabolismo "in vitro" del MVA por la ruta de esteroides en hígado y riñón.

El efecto en hígado es clarísimo (figura 11): a partir de los 7 días disminuye la formación de insaponificables a casi la mitad en los pollos tratados (en comparación con los controles).

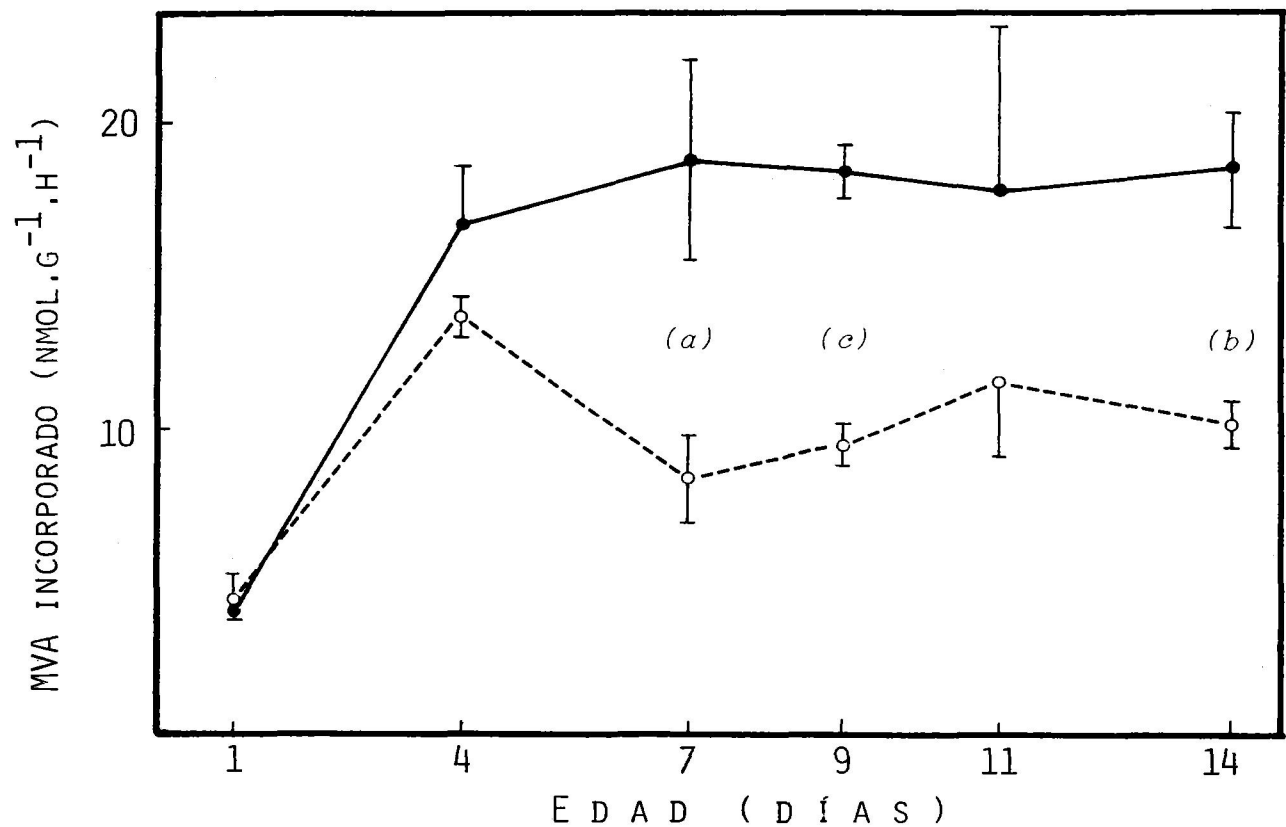


Figura 11. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre la incorporación de MVA a lípidos insaponificables por cortes de hígado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos, salvo los días 1 y 9 (cuatro exp.). Significación de las diferencias entre controles ( ●—● ) y tratados ( ○-----○ ): a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.02$ ; c,  $p < 0.0004$ .

Tabla 27. Variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA por cortes de hígado a distintos lípidos insaponificables aislados por cromatografía en capa fina

Edad (días)	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
1	0.079 <sup>±</sup> 0.043 (2%)	1.58 <sup>±</sup> 0.18 (37%)	0.33 <sup>±</sup> 0.07 (8%)	1.78 <sup>±</sup> 0.36 (42%)	0.48 <sup>±</sup> 0.31 (11%)
4	0.489 <sup>±</sup> 0.452 (3%)	2.13 <sup>±</sup> 0.42 (13%)	1.48 <sup>±</sup> 0.71 (9%)	6.24 <sup>±</sup> 2.96 (37%)	6.39 <sup>±</sup> 1.33 (38%)
7	0.052 <sup>±</sup> 0.040 (0%)	0.92 <sup>±</sup> 0.24 (5%)	0.59 <sup>±</sup> 0.09 (3%)	9.79 <sup>±</sup> 4.88 (52%)	7.38 <sup>±</sup> 2.20 (39%)
9	0.018 <sup>±</sup> 0.008 (0%)	0.92 <sup>±</sup> 0.21 (5%)	0.63 <sup>±</sup> 0.12 (4%)	7.79 <sup>±</sup> 1.60 (48%)	8.46 <sup>±</sup> 1.21 (44%)
11	0.171 <sup>±</sup> 0.057 (1%)	0.59 <sup>±</sup> 0.25 (3%)	0.60 <sup>±</sup> 0.17 (3%)	7.60 <sup>±</sup> 3.63 (43%)	8.81 <sup>±</sup> 2.94 (50%)
14	0.192 <sup>±</sup> 0.096 (1%)	0.63 <sup>±</sup> 0.18 (4%)	0.67 <sup>±</sup> 0.21 (4%)	7.75 <sup>±</sup> 0.91 (41%)	9.29 <sup>±</sup> 1.57 (50%)

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos. Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos no saponificables polares.

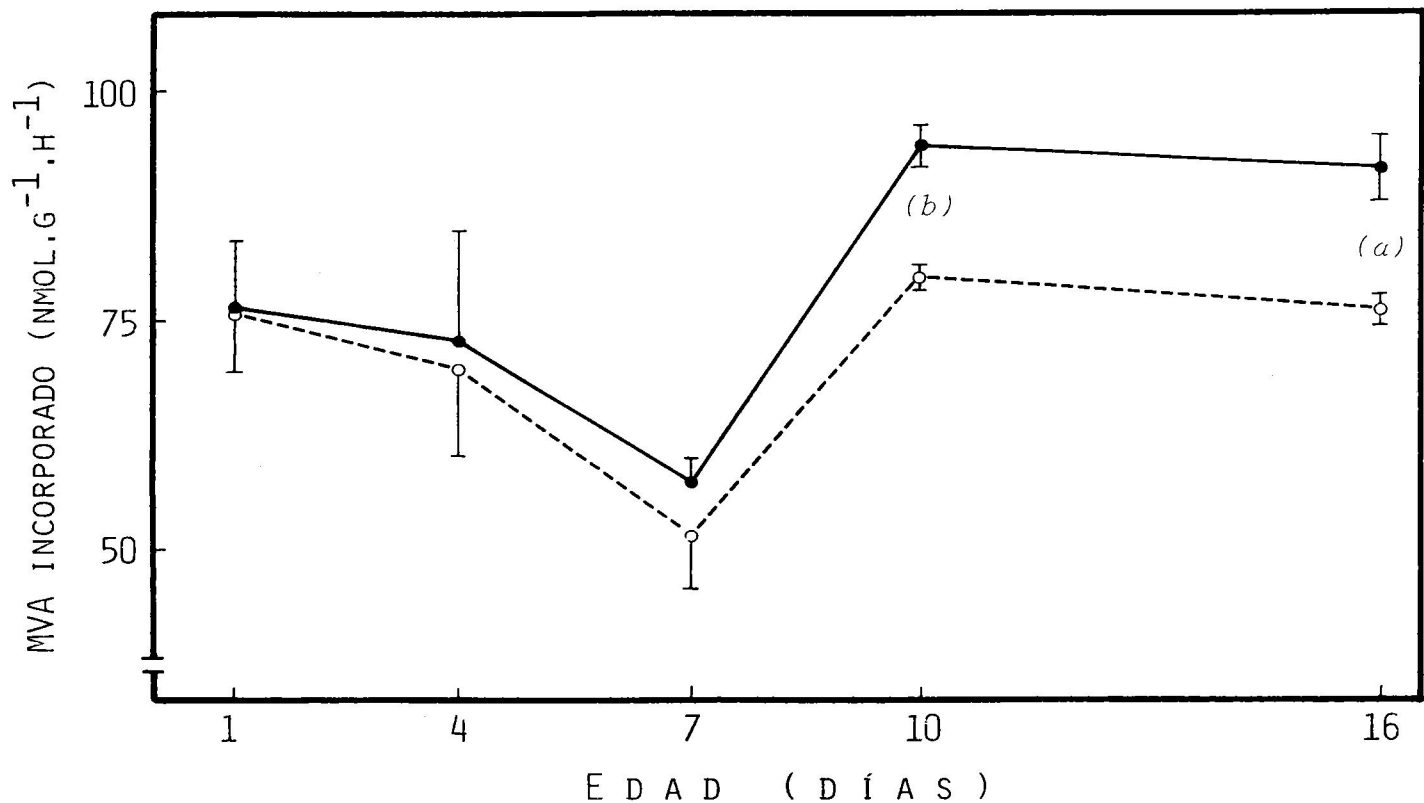


Figura 12 . Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre la incorporación de MVA a lípidos insaponificables por cortes de riñón. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos, salvo los días 1 , 16 (seis exp.) y 10 (cuatro exp.). Significación de las diferencias entre controles ( ●—● ) y tratados ( ○- - -○ ): *a*,  $p < 0.01$ ; *b*,  $p < 0.001$ . Entre controles de 7 y 10 días,  $p < 0.0005$ .

Tabla 28. Variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA por cortes de riñón a distintos lípidos insaponificables aislados por cromatografía en capa fina

Edad (días)	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
1	0.26 <sup>±</sup> 0.23 (0%)	1.01 <sup>±</sup> 0.54 (1%)	1.88 <sup>±</sup> 0.76 (2%)	78.76 <sup>±</sup> 15.25 (90%)	5.73 <sup>±</sup> 1.17 (7%)
4	1.58 <sup>±</sup> 0.86 (2%)	4.66 <sup>±</sup> 0.95 (6%)	4.35 <sup>±</sup> 0.83 (6%)	54.12 <sup>±</sup> 9.62 (75%)	7.89 <sup>±</sup> 1.70 (11%)
7	24.07 <sup>±</sup> 2.93 (42%)	5.67 <sup>±</sup> 1.17 (10%)	7.80 <sup>±</sup> 0.77 (14%)	12.05 <sup>±</sup> 7.15 (21%)	7.09 <sup>±</sup> 1.51 (13%)
10	27.21 <sup>±</sup> 4.61 (29%)	9.45 <sup>±</sup> 0.88 (10%)	19.49 <sup>±</sup> 3.10 (20%)	19.33 <sup>±</sup> 4.82 (20%)	19.67 <sup>±</sup> 1.06 (21%)
16	35.82 <sup>±</sup> 3.26 (40%)	6.97 <sup>±</sup> 0.51 (8%)	14.71 <sup>±</sup> 0.66 (16%)	13.66 <sup>±</sup> 2.87 (15%)	19.77 <sup>±</sup> 6.62 (22%)

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos, salvo los días 1 (6 exp.), 10 (4 exp.) y 16 (6 exp.). Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos no saponificables polares.

La inhibición se produce a costa, sobre todo, de una síntesis de colesterol muy inferior (figuras 27 y 29).

El colesterol de la dieta también provocó una inhibición de la incorporación de MVA a insaponificables en riñón, significativa a partir del día 10 (figura 12), si bien no tan acentuada como en el hígado. En cambio, no se inmuta la distribución de la radiactividad entre los distintos insaponificables (tablas 28 y 30). Todos estos resultados los comentaremos contrastados con los obtenidos en los pollos vivos.

Tabla 29. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre las variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación de MVA por cortes de hígado a distintos lípidos insaponificables aislados por cromatografía en capa fina

Edad (días)	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
1	0.063 <sup>±</sup> 0.037 (1%)	1.11 <sup>±</sup> 0.24 (26%)	0.35 <sup>±</sup> 0.19 (8%)	2.64 <sup>±</sup> 1.19 (61%)	0.16 <sup>±</sup> 0.16 (4%)
4	0.091 <sup>±</sup> 0.091 (0%)	2.05 <sup>±</sup> 1.01 (9%)	1.72 <sup>±</sup> 0.29 (8%)	14.42 <sup>±</sup> 3.72 (64%)	4.09 <sup>±</sup> 0.59 (18%)
7	0.000 <sup>±</sup> 0.000 (0%)	0.60 <sup>±</sup> 0.37 (7%)	0.39 <sup>±</sup> 0.20 (5%)	6.13 <sup>±</sup> 2.18 (73%)	1.24 <sup>±</sup> 0.62 <sup>a</sup> (15%)
9	0.247 <sup>±</sup> 0.160 (2%)	1.82 <sup>±</sup> 0.15 <sup>b</sup> (18%)	0.59 <sup>±</sup> 0.07 (6%)	5.43 <sup>±</sup> 2.31 (54%)	1.95 <sup>±</sup> 1.02 <sup>b</sup> (19%)
11	0.097 <sup>±</sup> 0.071 (1%)	1.21 <sup>±</sup> 0.21 (11%)	0.68 <sup>±</sup> 0.31 (6%)	6.20 <sup>±</sup> 0.45 (54%)	3.32 <sup>±</sup> 1.18 (29%)
14	0.000 <sup>±</sup> 0.000	0.79 <sup>±</sup> 0.08	0.16 <sup>±</sup> 0.04	7.46 <sup>±</sup> 0.70	1.75 <sup>±</sup> 0.39 <sup>c</sup>

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos. Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos no saponificables polares. Significación de las diferencias con los correspondientes valores controles (tabla 27): *a*, p<0.1; *b*, p<0.05; *c*, p<0.01.

Tabla 30. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre las variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación de MVA por cortes de riñón a distintos lípidos insaponificables aislados por cromatografía en capa fina

Edad (días)	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
1	0.43 <sup>±</sup> 0.39 (1%)	1.93 <sup>±</sup> 1.28 (3%)	3.05 <sup>±</sup> 1.34 (4%)	63.18 <sup>±</sup> 8.31 (82%)	8.03 <sup>±</sup> 0.20 (10%)
4	7.31 <sup>±</sup> 5.37 (10%)	6.81 <sup>±</sup> 3.26 (10%)	5.90 <sup>±</sup> 1.55 (8%)	40.87 <sup>±</sup> 9.48 (58%)	9.34 <sup>±</sup> 1.43 (13%)
7	13.98 <sup>±</sup> 0.82 <sup>b</sup> (27%)	10.41 <sup>±</sup> 1.77 <sup>a</sup> (20%)	11.11 <sup>±</sup> 0.92 <sup>a</sup> (22%)	9.69 <sup>±</sup> 1.59 (19%)	6.41 <sup>±</sup> 0.82 (12%)
10	24.16 <sup>±</sup> 4.93 (30%)	8.24 <sup>±</sup> 0.60 (10%)	12.54 <sup>±</sup> 1.57 (16%)	11.78 <sup>±</sup> 1.28 (14%)	24.35 <sup>±</sup> 4.50 (30%)
16	32.87 <sup>±</sup> 3.75 (42%)	8.80 <sup>±</sup> 0.85 <sup>a</sup> (11%)	14.05 <sup>±</sup> 1.03 (18%)	12.08 <sup>±</sup> 2.41 (16%)	9.75 <sup>±</sup> 1.80 (12%)

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos, salvo el día 10 (4 exp.). Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos no saponificables polares. Significación de las diferencias con los correspondientes valores controles (tabla 28):

a, p<0.1; b, p<0.05; c, p<0.01.



### 3. Estudios sobre el metabolismo del mevalonato por la ruta de esteroides "in vivo".

Las experiencias de incorporación "in vivo" de apar-  
tados anteriores fueron realizadas con pollos de 9-10 días de edad.  
Una vez establecidas algunas características de la dinámica del  
MVA por las dos rutas en estudio, estábamos en condiciones de in-  
dagar acerca de su regulación fisiológica.

400 nmol de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA eran inyectados intrape-  
ritonealmente a los pollos a las 9.00 a.m. (cuando comenzaba el  
período luminoso). Al cabo de 90 minutos, los pollos eran matados  
por decapitación para la rápida extracción del hígado y de los ri-  
ñones.

Discutiremos en primer lugar los resultados obtenidos  
en hígado.

#### 3.1. Estudio "in vivo" del control de la incorporación de mevalona- to a distintos lípidos insaponificables en hígado.

##### 3.1.1. Evolución postnatal.

En el hígado tiene lugar, desde las horas posteriores  
a la eclosión hasta los 5 días -coincidiendo con el incremento de-  
tectado "in vitro" (figura 11)-, un espectacular aumento (de más  
de 10 veces) de la acumulación de lípidos insaponificables totales,  
seguido de una elevación más suave (2 veces) hasta los 11-15 días  
(figura 13). El acontecimiento que probablemente dispara la biosín-  
tesis es la involución del saco vitelino, con los consiguientes cam-  
bios en los niveles de colesterol en el hígado y suero de los pollos  
a lo largo de los primeros días de vida postnatal.

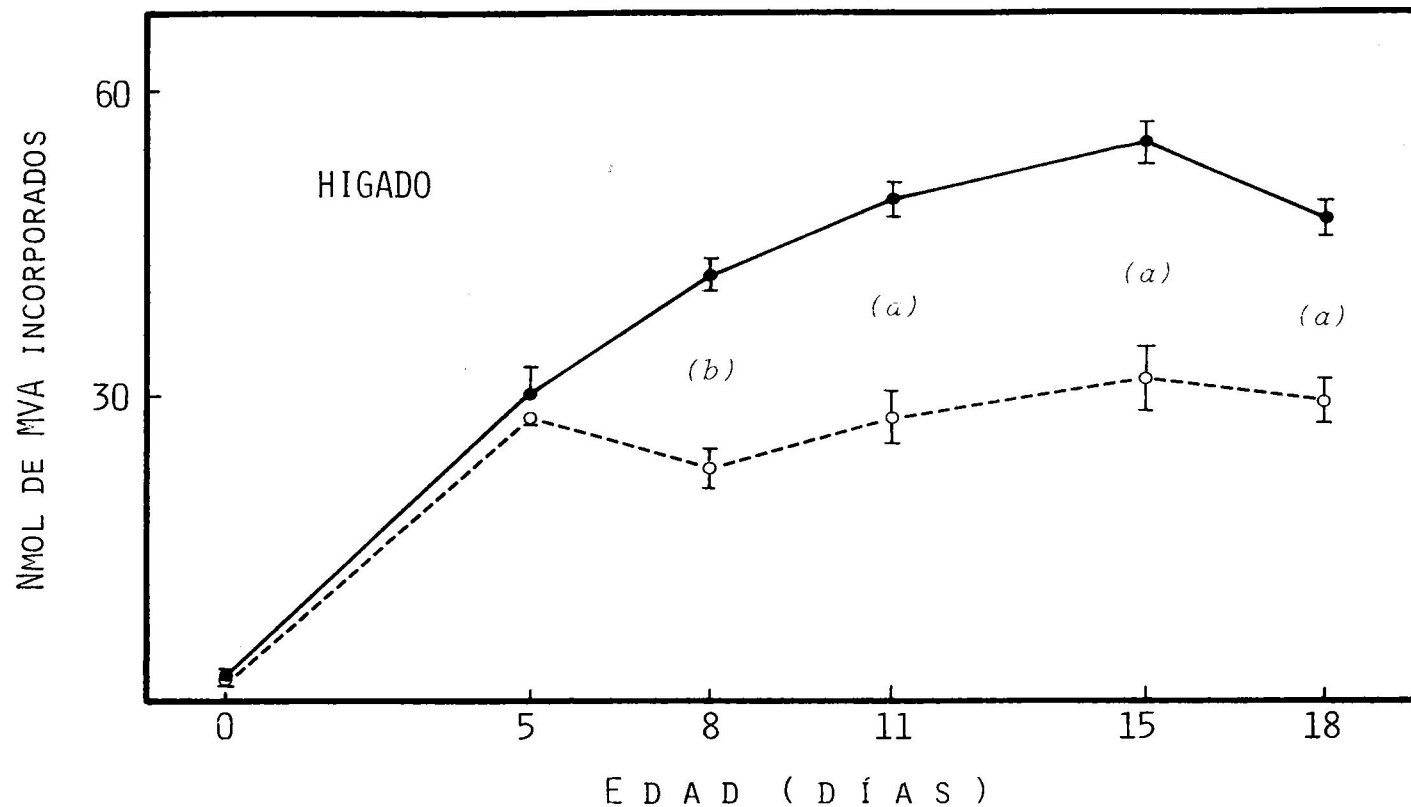


Figura 13. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre la evolución de la incorporación *in vivo* de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables de hígado a lo largo de la edad. Los resultados son la media ± error estándar de la media de tres experiencias. Significación de las diferencias entre valores controles ( ●—● ) y tratados ( ○-----○ ): a, p<0.005; b, p<0.001.

El estudio de la distribución de la radiactividad entre varios insaponificables a lo largo de la edad fue muy clarificador, por lo que lo discutiremos con detalle.

En el hígado (figura 14), el aumento de la síntesis de insaponificables se debió sobre todo al colesterol. Su porcentaje relativo -en relación a los insaponificables totales- creció progresivamente desde un 28% (recién nacidos) hasta un 96% (11 días). El escualeno fue el producto marcado que se acumuló en mayor cantidad en los recién nacidos (49.9%), pero no a los 5 días (16.5%) ni a los 8 (0.7%), lo que sugiere una activación progresiva de una/s enzima/s inicialmente limitante/s del metabolismo del escualeno. Tal activación aparentemente originó una mayor formación de lanosterol y quizá de insaponificables polares. La máxima conversión de lanosterol -mínima acumulación- se alcanzó a los 8 días, mientras que esto no ocurría para los insaponificables polares hasta los 11 días. La evolución de los compuestos marcados que migran con el Rf de la ubiquinona (en la cromatografía en capa fina empleada) fue similar a la del escualeno, descendiendo bruscamente entre los 5 y 8 días.

Los porcentajes de los diversos insaponificables acumulados "in vivo" diferían de los correspondientes "in vitro" (tabla 28). La síntesis de insaponificables polares "in vitro" es mucho mayor -siempre en torno al 40%- y, en cambio, la de colesterol mucho más baja -50% como máximo-. Esta ha resultado ser una característica general de los experimentos "in vitro", quizá consecuencia del alto (95%) contenido en  $O_2$  del medio de incubación.

Las variaciones temporales apreciadas "in vitro" coincidían con las ahora observadas en lo referente al incremento del porcentaje de colesterol y al descenso del lanosterol y de los compuestos que migran como ubiquinona. Sin embargo, la síntesis de escualeno no era tan alta en los pollos recién nacidos, ni el descenso de los insaponificables polares a partir de los 8-9 días tan acusado. De nuevo, es probable que ese no acúmulo de escualeno y no descenso de los insaponificables polares venga en parte condicionado por el alto contenido en  $O_2$  del medio de incubación de los cortes de tejido.

#### Caracterización de los compuestos marcados de naturaleza desconocida.

La elucidación de la identidad de los compuestos marcados que migraban como ubiquinona-10 ( $R_f = 0.63$ ) y de los insaponificables polares ( $R_f < 0.22$ ) era problemática, pues, en el segundo caso, carecíamos de medios técnicos suficientes para averiguar la estructura de lo que podían ser óxidos de esteroides y, en el primero, manteníamos la duda de que las técnicas utilizadas para caracterizar la ubiquinona (Faust y col. 1979a, Volpe y Obert 1982, Wiss y Wiss 1977a) fueran concluyentes. En efecto, recientemente se ha demostrado que algunos óxidos de escualeno muestran unas propiedades físico-químicas tales que los hacen de difícil distinción de la ubiquinona (Sexton y col. 1983).

Por todo ello ideamos como método más concluyente para localizar los compuestos en la ruta colesterogénica la incubación de los productos no identificados y de sus posibles precursores y derivados marcados (escualeno, lanosterol, colesterol) con

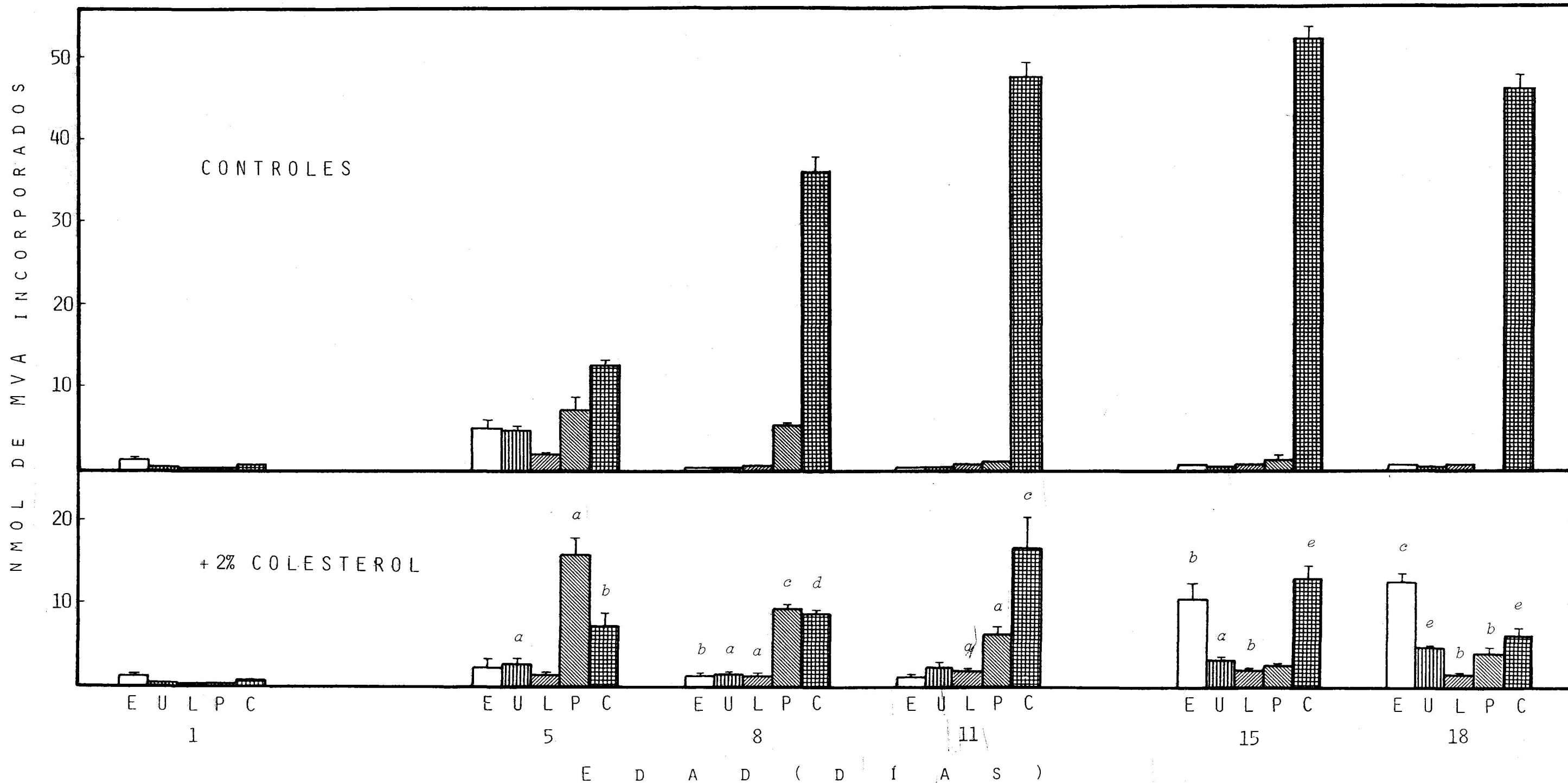


Figura 14. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre las variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación *in vivo* de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA a distintos lípidos insaponificables aislados de hígado. Los valores son la media ± error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos. Significación de las diferencias entre controles y tratados: a, p 0.1; b, p 0.05; c, p 0.01; d, p 0.001; e, p 0.0001. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein.



dos tipos de homogenados de hígado, seguida de la caracterización de los productos formados. Utilizamos homogenados hepáticos de pollos de 18 días para incubar los dos grupos de compuestos no identificados, ya que con esa edad no se acumulan apenas en hígado y cabe esperar su rápido metabolismo. En cambio, para ensayar los posibles precursores, empleamos homogenados hepáticos de pollos de 5 días, edad a la que los compuestos no identificados se acumulan. Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 31.

Como los compuestos que migran como la ubiquinona-10 sólo se forman a partir de escualeno y son convertidos solamente en lanosterol, colesterol y lípidos no saponificables polares (LNSP), es evidente que la gran mayoría de aquellos compuestos marcados no son moléculas de ubiquinona, sino precursores de la síntesis de lanosterol derivados de escualeno. Es decir, probablemente óxido/s de escualeno.

Los compuestos con  $R_f < 0.22$  (LNSP) se incorporan únicamente a colesterol y son sintetizados a partir de todos los precursores ensayados excepto el colesterol. Por consiguiente, parecen ser derivados del lanosterol pero no del colesterol y, al menos en gran parte, precursores de éste.

Otro ensayo adicional para los LNSP consistió en el intento de precipitación con digitonina, proceso específico de ciertos 3 $\beta$ -hidroxiesteroides (como el colesterol). En este ensayo (tabla 32) tanto los LNSP como el lanosterol no precipitan casi nada, mientras que el 85.6% de los compuestos con el  $R_f$  del colesterol sí lo hacen. Esto sugiere que la mayoría de los LNSP

Tabla 31. Incorporación *in vitro* de (<sup>3</sup>H)colesterol y de diversos derivados marcados del MVA aislados tras la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA del hígado de pollos controles de 5 días

Producto (% relativo de radiact.)	Sustrato				
	** E	* U	** L	* P	** C
E	13	-	-	-	-
U	13	9	-	-	-
L	7	19	35	-	1
P	31	28	26	64	2
C	36	41	39	36	97

Los resultados representan el % de radiactividad encontrado en cada producto tras la incubación con homogenados hepáticos de pollos controles de 5 (\*\*) o 18 (\*) días de diversos compuestos aislados en hígado 90 minutos después de la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA a pollos controles de 5 días y de (<sup>3</sup>H)colesterol. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares (Rf<0.22) y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Sipers-tein (1974).



Tabla 32. Precipitación con digitonina de diversas fracciones marcadas aisladas tras la incorporación *in vivo* de MVA

Compuestos	% precipitados
LNSP-hígado de pollos de 5 días controles	0.1
LNSP-hígado de pollos de 18 días controles	0.6
LNSP-hígado de pollos de 18 días '+2% col.'	13.7
Colest.-hígado de pollos de 5 días controles	85.6
Colest.-hígado de pollos de 18 días controles	72.8
Lanost.-hígado de pollos de 5 días controles	3.3
LNSP-riñones de pollos de 5 días controles	30.3
Colest.-riñones de pollos de 18 días controles	71.0
Lanost.-riñones de pollos de 5 días controles	2.4

LNSP= lípidos no saponificables polares.

son derivados del lanosterol sustituidos en el C-4, ya que la mayor parte de tales compuestos no precipitan con digitonina (Good y Goodwin 1966).

Secuencia de los cambios hepáticos en las actividades colesterogénicas tras la eclosión del pollo.

En el hígado de los pollos recién nacidos, la ruta de formación de lípidos insaponificables a partir de MVA es muy poco activa. Durante los 5 primeros días tras la eclosión, el metabolismo del MVA hacia la formación de escualeno aumenta drásticamente, pero la actividad de las etapas subsiguientes es aún limitada, originando tal situación un gran acúmulo de escualeno, óxido/s de escualeno, lanosterol y derivados polares del lanosterol.

Entre los 5 y los 8 días se activa especialmente la conversión de escualeno a derivados de lanosterol y finaliza la acumulación de escualeno y lanosterol. Sólo después de los 8 días la conversión de derivados de lanosterol en colesterol se hace completamente activa.

Los cambios observados entre la eclosión y los 5 días concuerdan con un gran aumento de la actividad PPMVA descarboxilasa (González-Pacanowska y col. 1984). Asimismo, en nuestro laboratorio se ha detectado un gran incremento de la actividad HMG-CoA reductasa hepática -y, por consiguiente, del MVA disponible- pero solamente después de los 5 días (Alejandre y col. 1981), lo que coincide con la progresiva activación de la conversión de derivados polares del lanosterol en colesterol. Nuestros resultados explican además que la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en hígado aumente entre

1 y 4 días (Alejandre y col. 1981).

Lógicamente, la primera cuestión que se nos plantea es acerca de la causa de estos sorprendentes incrementos secuenciales de las actividades enzimáticas. Como ya vimos, el nivel del almacén hepático de colesterol esterificado sufre una pronunciada caída tras la eclosión. Lo cual podría exigir la necesidad de sintetizar el colesterol, pues normalmente los pollos toman una dieta esencialmente glucídica, sin colesterol, y, debido a su rápido desarrollo (tabla 33), tienen fuertes requerimientos de ese compuesto (Trentalance y col. 1984, Brown y Goldstein 1980, Kaneko y col. 1978, Kandutsch y Chen 1977, Cornell y col. 1977, Siperstein 1984).

Es algo semejante a lo que ocurre en el hígado de las ratas tras el destete. En estos animales, la incorporación de acetato y glucosa a colesterol (Carroll 1964, Ballard y Hanson 1967), la incorporación de MVA a lípidos insaponificables y a esteroides precipitables con digitonina (Shah 1973, Johnson y Shah 1974), la incorporación de escualeno a esteroides precipitables con digitonina (Johnson y Shah 1974), y las actividades 7-dehidrocolesterol reductasa microsomal (Wróbel 1972), PPMVA descarboxilasa (Ramachandran y Shah 1976) y HMG-CoA reductasa (McNamara y col. 1972) aumentan fuertemente con el cambio de dieta que conlleva el destete, si bien este cambio no se refleja como en los pollos en un acusado descenso del contenido hepático de colesterol.

Las conversiones de derivados polares del lanosterol en colesterol y la de HMG-CoA en MVA parecen ser las más sensibles a la inhibición en la situación en que aumenta el colesterol almacenado, pues son las últimas que se activan completamente en

Tabla 33. Variaciones del peso corporal y del peso del hígado, de los riñones y del encéfalo de los pollos a lo largo del desarrollo postnatal

Edad (días)	Peso (g)			
	Pollo	Hígado	Riñones	Encéfalo
1	41 <sup>±</sup> 1	0.93 <sup>±</sup> 0.04	0.29 <sup>±</sup> 0.01	0.83 <sup>±</sup> 0.02
4	45 <sup>±</sup> 2	1.65 <sup>±</sup> 0.06	0.43 <sup>±</sup> 0.02	1.18 <sup>±</sup> 0.02
8	60 <sup>±</sup> 3	1.99 <sup>±</sup> 0.14	0.56 <sup>±</sup> 0.01	1.29 <sup>±</sup> 0.02
11	77 <sup>±</sup> 3	3.03 <sup>±</sup> 0.14	0.85 <sup>±</sup> 0.04	1.32 <sup>±</sup> 0.03
15	118 <sup>±</sup> 5	3.88 <sup>±</sup> 0.16	1.35 <sup>±</sup> 0.05	1.69 <sup>±</sup> 0.03
23	217 <sup>±</sup> 6	6.58 <sup>±</sup> 0.53	2.28 <sup>±</sup> 0.06	1.80 <sup>±</sup> 0.03

Los valores representan la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los pesos obtenidos de 10 pollos.

en el desarrollo del pollo. Por el mismo argumento, le seguirían en sensibilidad a la inhibición por colesterol las conversiones (en productos derivados) de escualeno y de lanosterol (y quizá de algún otro intermediario anterior). Por último, pues se activa cuando hay aún gran cantidad de colesterol almacenado, la incorporación de MVA a escualeno, incluyendo la actividad PPMVA descarboxilasa.

Si la hipótesis expuesta es válida, es decir, si los cambios en el metabolismo hepático del MVA en el pollo tras la eclosión son derivados del agotamiento del almacén de colesterol esterificado, cabría esperar que la suplementación de la comida con un 2% de colesterol -que, como vimos (tabla 16, figura 10), incrementa el contenido de colesterol esterificado en hígado, aunque no hasta los niveles iniciales- los atenúe. Atendiendo a la bibliografía (Johnson y Shah 1974, Wiss y Wiss 1977b), cabe esperar un aumento de la acumulación de escualeno marcado (a partir de ( $^{14}\text{C}$ )MVA). Wiss y Wiss (1977b) hablan de un aumento de la incorporación de MVA a ubiquinona por efecto de la dieta rica en colesterol, pero sólo se basan para identificar tal compuesto en su Rf por cromatografía en capa fina.

### 3. 1. 2. Efecto de la ingesta de colesterol sobre la evolución postnatal.

Como era de esperar, la producción de lípidos insaponificables disminuyó por efecto de la dieta enriquecida en colesterol (figura 13). A partir del octavo día de vida postnatal, el descenso respecto a los valores controles fue de un 42.4% por término medio, debido sobre todo a una caída media en la síntesis de

colesterol del 75.4% (figura 14). Apareció, principalmente a partir de las 2 semanas de dieta alta en colesterol, un acúmulo mucho mayor -respecto a los pollos controles- de escualeno, lanosterol (en estos dos casos, unas 20 veces mayor), LNSP y compuestos que migran como la ubiquinona-10. De tal forma que se restablecieron aproximadamente las proporciones relativas de los primeros días en pollos controles, si bien ahora con valores absolutos más elevados. Pero recordemos que tampoco los niveles de colesterol esterificado hepático suben hasta los valores iniciales.

Se ha sugerido que el retrocontrol de signo negativo de la síntesis hepática de colesterol se induce por el incremento en colesterol total o esterificado en el propio hígado (Frantz y col. 1954, Gould y Swyryd 1966, Harry y col. 1973, Nervi y Dietschy 1975 ). Según Erickson y col. (1975), el colesterol esterificado unido a la cromatina en el núcleo puede desempeñar un papel en la regulación. Sin embargo, la velocidad de síntesis de colesterol no está siempre relacionada con la concentración hepática de colesterol total o esterificado (Takeuchi y col. 1976), por lo que cabe pensar que participan otros factores en la regulación.

De gran interés resulta, de nuevo, la comparación del efecto de la ingesta de colesterol que hemos observado en el hígado de los pollos tras la eclosión con el que produce en la rata tras el destete. Esta última situación la estudiaron Johnson y Shah (1974), demostrando que la adición de un 1% de colesterol a la dieta evita el aumento de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables y esteroides precipitables con digitonina y de escualeno a esteroides precipitables con digitonina, que tienen lugar

tras el destete. Esta influencia de la ingesta de colesterol refuerza la hipótesis de que es el cese del suministro del colesterol de la leche (mientras en los pollos es el cese de este aporte por el saco vitelino) lo que dispara el aumento de actividades esterologénicas (a pesar de que, a diferencia del pollo, en el hígado de la rata lactante no se elevan los niveles de colesterol).

El hecho de que la adición de un 1% de colesterol a la dieta de las ratas elimine la subida de actividades mientras que un 2% en la dieta de los pollos sólo la atenúe, es probable que se deba en parte al mucho mayor aporte de colesterol que supone el saco vitelino -que tiene aproximadamente un 3% de colesterol respecto al peso seco (Becker y col. 1977)- frente a la leche -con sólo un 0.6% de colesterol-.

Pero además, es probable que los niveles de colesterol (y de otros compuestos) de la leche o del saco vitelino no sean los únicos factores determinantes de la evolución de los cambios. En el pollo la lipogénesis es muy baja durante el desarrollo embrionario (Kilsheimer y col. 1960). Con la eclosión y la ingesta de una dieta glucídica la lipogénesis se dispara (Goodridge 1968a), así como las actividades ATP-citrato liasa, malato NADPH deshidrogenasa (Goodridge 1968b), piruvato quinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Eppenberger y col. 1963). (En cambio, en el hígado de fetos de mamíferos la lipogénesis es activa, disminuye rápidamente tras el nacimiento y aumenta de nuevo cuando acaba la lactancia (Roux 1966, Ballard y Hanson 1967)).

Lo que queremos destacar ahora es la constatación, por Pearce (1977), de un incremento en las actividades específicas hepáticas de la ATP-citrato liasa, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa después de la eclosión pero antes de que los pollos empiecen a comer, mientras que la actividad malato deshidrogenasa descarboxilante (NADPH) no aumenta su actividad hasta que comienza la ingesta. Estos hechos sostienen la posibilidad de que intervengan en los aumentos neonatales de actividad tanto factores nutricionales como otros, tal vez mediados por hormonas.

El papel de las hormonas en la estimulación neonatal de actividades enzimáticas del pollo ha recibido cierta atención. Se ha conseguido forzar en hepatocitos de embrión de pollo una inducción de la malato deshidrogenasa descarboxilante (NADPH) (Goodridge y Adelman 1976), de la acetil-CoA carboxilasa y de la ácido graso sintetasa (Goodridge y Fisher 1978) por hormonas tiroideas más insulina. Ryder y Campos (1979a) lograron una estimulación de la actividad acetil-CoA carboxilasa por glucagón en hepatocitos de embrión de pollo. Joshi y Wakil (1978) encontraron un incremento de la actividad ácido graso sintetasa hepática de embriones tras la administración "in vivo" de insulina, glucagón y AMP cíclico; sugirieron que la hormona activa es la insulina y que el glucagón y el AMP cíclico actúan indirectamente aumentando los niveles de insulina circulante.

No obstante, parece que la insulina desempeña un papel menos importante en el control del metabolismo del pollo que en el de la rata (Goodridge y col. 1974, Pearce 1980). Además,



Ryder y Campos (1979b) vieron que la cantidad de insulina circulante en el embrión desciende a partir del 16º día de incubación, y que en pollos recién nacidos el propiltiouracilo inhibe la actividad acetil-CoA carboxilasa, lo que les hizo suponer que las hormonas tiroideas son más importantes que la insulina en la aparición de esa actividad durante el período perinatal.

De hecho, poco antes de la eclosión, y durante ésta, tiene lugar un gran incremento transitorio de los niveles plasmáticos de tiroxina total (Davison 1976). Como quiera que la tiroxina estimula la síntesis de colesterol, la actividad HMG-CoA reductasa (Ness y col. 1973) y la incorporación de MVA a esteroides (Feingold y col. 1980b), podría pensarse que son estas hormonas las que desempeñan el papel crucial en la subida de esas actividades (sobre todo, de la incorporación de MVA, que ocurre desde el mismo día de la eclosión), mientras que el cambio de dieta sería sólo un factor potenciador (algo similar a lo que se ha sugerido para la activación post-eclosión de la malato NADP deshidrogenasa hepática (Greengard y Thorndike 1974).

#### Caracterización de compuestos.

Como ya hicimos anteriormente, para delimitar la naturaleza (y la situación en la ruta de síntesis de colesterol) de los compuestos que migran en la cromatografía en capa fina como la ubiquinona-10 y de los LNSP, los reincubamos -tras su aislamiento- con homogenados hepáticos de pollos controles de 18 días. Además incubamos colesterol, lanosterol y escualeno marcados con homogenados hepáticos de pollos tratados (con una dieta enriquecida en colesterol) de 18 días.

Los resultados (tabla 34) fueron semejantes a los que obtuvimos con los productos no identificados de los hígados de pollos de 5 días. Los compuestos que migran como ubiquinona parecen ser casi totalmente precursores de lanosterol, probablemente óxido/s de escualeno. El resultado fue el mismo cuando ensayamos los productos marcados que migran como ubiquinona ( $R_f = 0.48$ ) en el sistema cromatográfico -que utiliza como líquido de desarrollo cloroformo puro- empleado por Faust y col. (1979a) y por Volpe y Obert (1982).

Los LNSP se comportaron una vez más como derivados del lanosterol. En esta ocasión, un porcentaje mayor (13.6%) de los productos radiactivos precipitaron con digitonina (este porcentaje fue del 3.3% en el caso del lanosterol). Por consiguiente, ahora eran más abundantes (entre los LNSP) los esteroides C-4 desmetilados.

En definitiva, la dieta rica en colesterol dio el resultado esperado en el sentido de atenuar la elevación de actividades hepáticas durante los primeros días de desarrollo postnatal, hasta restaurar, a partir de las dos semanas las proporciones iniciales (aproximadamente) de los diversos lípidos insaponificables marcados a partir de (5- $^{14}$ C)MVA.

Del mayor interés resultó la rápida (a los 5 días) inhibición de la transformación de derivados oxidados de lanosterol en colesterol, que coincide con la mayor síntesis de LNSP a partir de MVA mostrada "in vitro" por los hígados de los pollos de 5 días que ingerían colesterol. Esta inhibición tiene lugar cuando la actividad HMG-CoA reductasa aún no se ve significativamente influen-

Tabla 34. Incorporación *in vitro* de diversos derivados marcados del MVA aislados tras la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA del hígado de pollos alimentados con una dieta rica en colesterol

Producto (% relativo de radiact.)	Sustrato					
	** E	* U	* U'	** L	* P	** C
E	19	-	-	-	-	-
U	10	25	15	-	-	-
L	6	18	8	33	-	1
P	27	30	52	30	55	2
C	38	27	25	37	45	97

Los valores son el resultado de la incubación con homogenados hepáticos de pollos de 18 días controles (\*) o alimentados con una dieta rica (2%) en colesterol (\*\*) de diversos compuestos marcados aislados en hígado 90 min después de la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA a pollos de 18 días alimentados con dieta rica en colesterol. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares (Rf<0.22) y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974). Con U' nos referimos a ubiquinona utilizando cloroformo como solvente.

ciada por el colesterol de la dieta (Alejandre y col. 1980). Asimismo, la incorporación de MVA a lípidos insaponificables -y, por tanto, toda actividad enzimática entre MVA y escualeno- no se ve disminuida por la dieta rica en colesterol a los 5 días.

A los 8 días, la producción de lípidos insaponificables a partir de MVA es claramente más baja en los pollos que ingieren colesterol. Dado que la actividad PPMVA descarboxilasa únicamente se inhibe por un 2 % de colesterol en la dieta desde los 11 días (González - Pacanowska 1983), parece ser que al menos otra enzima localizada entre isopentenil-PP y escualeno se inhibe antes. El escualeno se acumula a partir de los 8 días y, especialmente, desde el día 15.

#### Hipótesis de los oxisteroles.

¿Qué sentido puede tener la rápida inhibición de la conversión hepática de derivados polares del lanosterol en colesterol por efecto de la ingesta de éste?. En 1973, Kandutsch y Chen comunicaron que la adición de colesterol purificado a cultivos celulares primarios de células hepáticas de fetos de ratón no inhibe la biosíntesis de esteroides a partir de acetato ni la actividad HMG-CoA reductasa. En cambio, conocidos productos de la autooxidación del colesterol, como 7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol y 7 $\beta$ -hidroxicolesterol tienen una fuerte capacidad inhibidora.

Algunos derivados del colesterol con funciones oxigenadas en la cadena lateral (especialmente el 25-hidroxicolesterol) también resultaron potentes inhibidores (Kandutsch y Chen 1974). Actualmente son numerosos los derivados oxigenados del colesterol de origen sintético de los que se conoce tal capacidad inhibidora en

diversos tipos celulares (Brown y Goldstein 1974, Breslow y col. 1975, Mills y Adamany 1978, Bell y col. 1976, Kaneko y col. 1977, Cavenee y col. 1978, Sinensky y col. 1979, Chen y col. 1979, Fung y Khachadurian 1980, Erickson y Nes 1982, Tanaka y col. 1983, Taylor y col. 1984).

Algunos de esos derivados oxigenados son conocidos metabolitos del colesterol, y podrían servir como reguladores fisiológicos de la HMG-CoA reductasa, por ejemplo, si se encontrasen unidos a las LDL en cantidad suficiente (Kandutsch y col. 1978, Cavenee y col. 1981). Se han hecho multitud de estudios sobre los esteroides oxigenados en el C-15. Hasta el momento son los únicos esteroides oxigenados conocidos que suprimen la síntesis de colesterol de células en cultivo y que además poseen actividad hipocolesterolémica en animales intactos (Raulston y col. 1976, Kisic y col. 1977, Kisic y col. 1978, Schroepfer y col. 1977a, Schroepfer y col. 1980b). Sin embargo, su formación enzimática no se ha detectado en tejidos de mamíferos.

En suma, podemos afirmar con carácter general que no se tiene la menor evidencia de que los derivados oxigenados del colesterol funcionen, como sugieren Kandutsch y col. (1978) como reguladores fisiológicos de la reductasa, de la síntesis de esteroides y de la replicación celular.

En cualquier caso, la hipótesis de los oxisteroides se vería fortalecida si estos se encontraran en cantidad suficiente en el suero fresco para ejercer su acción. El oxisteroide más potente como supresor de la actividad reductasa citado en la literatura es el 25-hidroxicolesterol (Schroepfer 1981, Kandutsch y col.

1978), un producto de autooxidación del colesterol, pero que no se encuentra en el suero fresco (Javitt y col. 1981). El oxiesterol más abundante en el suero humano referido en la literatura es el 26-hidroxicolesterol, un intermediario de la biosíntesis de ácidos biliares (Vlahcevic y col. 1980). Sin embargo, para explicar el efecto supresor de las LDL en términos del 26-hidroxicolesterol, su contenido en estas lipoproteínas debería ser, al menos, 270 veces mayor que el encontrado (Chang 1983). Así pues, de ejercer algún derivado oxigenado del colesterol tal función, debe formarse probablemente tras la entrada de las LDL a las células.

Otra serie de investigaciones -mucho menos numerosa- se ha dirigido al estudio de la capacidad inhibidora de precursores oxigenados del colesterol. La triple desmetilación del lanosterol para dar lugar a colesterol supone la oxidación progresiva de tres restos metilo, a través de un gran número de etapas (Trzaskos y col. 1984, Paik y col. 1984). Colest-8(14)-en-3 $\beta$ ,-15 $\alpha$ -diol, colest-8(14)-en-3 $\beta$ , 15 $\beta$ -diol, 14 $\alpha$ -metil-colest-7-en-3 $\beta$ , 15 $\beta$ -diol y colest-8(14)-en-3 $\beta$ -ol-15-ona, que son convertidos en colesterol por preparaciones enzimáticas de hígado de rata, son potentes inhibidores de la síntesis de esteroides en cultivos de células animales (Schroepfer y col. 1977b). Sonoda y Sato (1983) han estudiado en rata el efecto inhibidor de 14 derivados estructurales del lanosterol sobre la conversión de éste en colesterol (esta capacidad inhibidora también la manifiestan oxiesteroides derivados del colesterol (Sato y col. 1984)).

Hay que hacer notar que el papel de los esteroides 15-oxigenados como posibles intermediarios de la biosíntesis del colesterol es incierto. Por ello, puede ser más relevante la demos-

tración de que la síntesis de esteroides y la actividad HMG-CoA reductasa se inhiben por  $14\alpha$ -hidroximetil y  $14\alpha$ -formil esteroides preparados por síntesis química (Schroepfer y col. 1980a, Gibbons y col. 1980, Schroepfer y col. 1978), puesto que la hidroxilación del grupo  $14\alpha$ -metilo y la subsiguiente conversión del  $14\alpha$ -hidroximetilesterol al correspondiente  $14\alpha$ -formilesterol se consideran generalmente reacciones enzimáticas obligatorias para la eliminación del metilo en posición 14. Parece clara la posibilidad de que tales esteroides sean reguladores naturales de la síntesis de colesterol, pero, desgraciadamente, no se ha aportado evidencia alguna que no parta de compuestos de síntesis química.

Muy recientemente, Panini y col. (1984), utilizando el compuesto U18666A, un inhibidor de la 2,3-óxidoescualen ciclasa (y de la desmosterol reductasa) que estimula la producción de 2,3:22,23-dióxido de escualeno, han sugerido que oxisteroides derivados de tal dióxido pueden actuar como reguladores fisiológicos de la reductasa, y que la inhibición de esta actividad por parte de las LDL podría estar mediada por esos oxisteroides endógenos -que no provienen de, ni dan lugar a colesterol- generados tras la inhibición de la ciclasa.

Cualesquiera que sean los oxisteroides que funcionan -en el sentido que venimos considerando- "in vivo" (si es que tal cosa sucede), su actividad inhibidora de la reductasa parece mediada por su unión específica a una proteína citosólica (Taylor y col. 1984, Kandutsch y col. 1984).

Según Chang (1983), "la hipótesis de que ciertos esteroides oxigenados intermediarios en el proceso de desmetilación del lanosterol puedan servir como importantes supresores fisiológicos de la actividad HMG-CoA reductasa se vería reforzada si tales esteroides inhibidores pudieran encontrarse en cantidad suficiente -formados por síntesis endógena- en el interior de las células; además, debería demostrarse que una acumulación incrementada de tales esteroides conduce a una mayor supresión de la actividad reductasa."

Demostración del acúmulo "in vivo" de oxisteroides que presumiblemente inhiben la actividad HMG-CoA reductasa, no derivados del colesterol: un modelo de regulación múltiple y secuencial que involucra a derivados polares del lanosterol.

Tras esta breve revisión del estado actual de la hipótesis de los oxisteroides, se comprenderá la posible importancia del acúmulo de derivados oxigenados del lanosterol que nosotros encontramos en el hígado de los pollos recién nacidos o después de ingerir una dieta rica en colesterol. Este acúmulo satisface la primera condición que, como acabamos de citar, exigía Chang.

De la segunda condición (que el acúmulo de oxisteroides debe conducir a una inhibición de la reductasa) sólo tenemos en principio el hecho de que dicho acúmulo parece ser anterior -o, como mucho, simultáneo- al descenso de actividad reductasa inducido por un alto suministro de colesterol al hígado. Pensamos que la hipótesis tendría una base mucho más firme si se pudiera demostrar que los derivados polares del lanosterol son inhibidores de la reductasa.



Así pues, sometimos de nuevo a 4 pollos a una dieta enriquecida con un 2% de colesterol. A los 18 días, los matamos y procedimos según la técnica habitual a la extracción de los LNSP del hígado. Por otra parte, extrajimos 4 h después de iniciado el período luminoso (para obtener una actividad reductasa elevada, dado su ritmo diurno) hepatocitos de pollos de 18 días alimentados con dieta estándar, y los resuspendimos en un medio de cultivo adecuado (MEM). Tal como se describe en la sección de 'Procedimientos experimentales', incubamos una parte de los hepatocitos con una cantidad proporcional de LNSP redissueltos en etanol y una solución de albúmina, y otra parte la incubamos con estas soluciones sin LNSP. Al cabo de 1 h, comenzamos la extracción de microsomas de una fracción de cada tipo de hepatocitos para determinar la actividad HMG-CoA reductasa y, simultáneamente, añadimos a otra fracción (1-<sup>14</sup>C)acetato con objeto de cuantificar su metabolismo a lípidos insaponificables y a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, y (5-<sup>14</sup>C)MVA a una tercera para medir su metabolismo por la ruta de esteroides.

Los resultados, espuestos en la tabla 35, fueron inequívocos. La adición de LNSP al cultivo de hepatocitos originó una reducción de un 64.1% de la actividad reductasa microsomal, y un descenso de la incorporación de acetato y MVA a insaponificables del 44.0% y 32.2%, respectivamente, sin afectar en absoluto a la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato.

Este conjunto de resultados supone la primera evidencia encontrada de un acúmulo de oxisteroides que, presumiblemente, poseen actividad inhibidora de la colesterologénesis. Naturalmente,

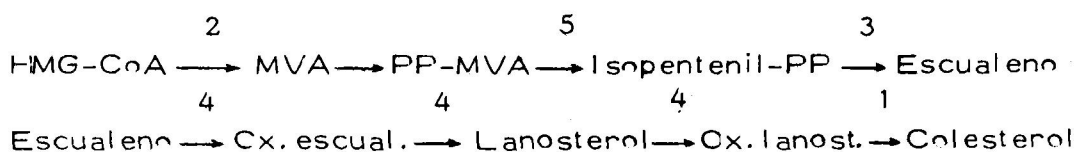
Tabla 35. Efecto de la adición de lípidos insaponificables polares aislados del hígado de pollos alimentados con una dieta rica en colesterol a cultivos de hepatocitos sobre diversas actividades colesterogénicas de éstos

Hepatocitos	% de actividad respecto a controles		
	actividad HMG-CoA R	incorporación de (1- <sup>14</sup> C) acetato	incorporación de (5- <sup>14</sup> C) MVA
Controles	100	100	100
+ LNSP	36	56	68

Los lípidos no saponificables polares (LNSP) se incubaron durante 90 minutos con los hepatocitos, tras lo cual se llevaron a cabo las determinaciones de actividad. HMG-CoA R=hidroximetilglutaril coenzima A reductasa.

los esfuerzos deberán centrarse ahora en la identificación estructural de los LNSP acumulados, y en la comprobación, uno por uno, de su hipotético efecto sobre la síntesis del colesterol.

La secuencia de las inhibiciones de distintas etapas de la ruta colesterogénica por efecto de la ingesta de colesterol, puede esquematizarse así:



¿Qué sentido tiene?. Cabría postular el siguiente modelo, como hipótesis de trabajo para futuras indagaciones. La cuantiosa entrada de colesterol al hígado provoca una rápida inhibición de su síntesis a partir de lanosterol (1), dando lugar a un acúmulo de derivados oxigenados de éste. Tales compuestos a su vez deprimen la actividad reductasa (2). Los efectos nocivos de este descenso de actividad para las rutas sintéticas alternativas del MVA se atenúan por la posterior inhibición de la síntesis de escualeno a partir de isopentenil-PP (3), quizá en más de un paso, permitiendo un suficiente nivel de intermediarios para la síntesis de ubiquinona, dolicol e isopentenil-adenosina. El metabolismo de escualeno, que supone un gasto inútil de energía en esta situación, se inhibe más tarde (4). El postrer descenso de actividad PP-MVA descarboxilasa (5), cabe esperar que tenga que ver con el mantenimiento del nivel adecuado de intermediarios derivados del PP-MVA, que tal vez lleguen a estar en exceso. Lo mismo puede decirse de los cambios de actividad de la ruta cetogénica (recordemos que se activa muy pronto). Será de gran interés estudiar la regulación de la PP-MVA descarboxilasa y de la ruta cetogénica del MVA en relación con el control de la biosíntesis de ubiquinona, dolicol e isopentenil-adenosina.

### 3.2. Estudio "in vivo" del control de la incorporación de mevalonato a distintos lípidos insaponificables en riñón.

#### 3.2.1. Evolución postnatal.

Como ya vimos, "in vitro" se detecta un descenso de la producción renal de lípidos insaponificables a partir de MVA entre la eclosión y los 7 días, seguido por un aumento hasta los valores originales (aproximadamente).

En vista de esos resultados fue sorprendente que, "in vivo", la acumulación renal de insaponificables derivados del MVA circulante marcado creciese muy acusadamente -como en el caso del hígado- inmediatamente después de la eclosión, hasta tal punto que se multiplica por 10 durante los primeros 5 días y aumenta al doble a lo largo de la semana siguiente (figura 15). Tales hallazgos nos llevaron a repetir los experimentos "in vitro", obteniéndose un perfil semejante (tabla 36) al de la primera vez (figura 12).

En el caso del hígado, las grandes variaciones parecían disparadas por la drástica caída de los niveles de colesterol almacenados. Esta explicación, obviamente, no es pertinente para dar cuenta de los cambios renales. En primer lugar, los niveles de colesterol en riñón (tablas 17 y 18) no disminuyen significativamente tras la eclosión (los riñones no participan en el almacenamiento de colesterol).

Lo que nos permite atisbar mejor lo que ocurre es la comparación con la medida de actividades "in vitro". Ni la síntesis de insaponificables (tabla 36, figura 12) ni la actividad pirrofosfomevalonato descarboxilasa (González-Pacanowska 1983)

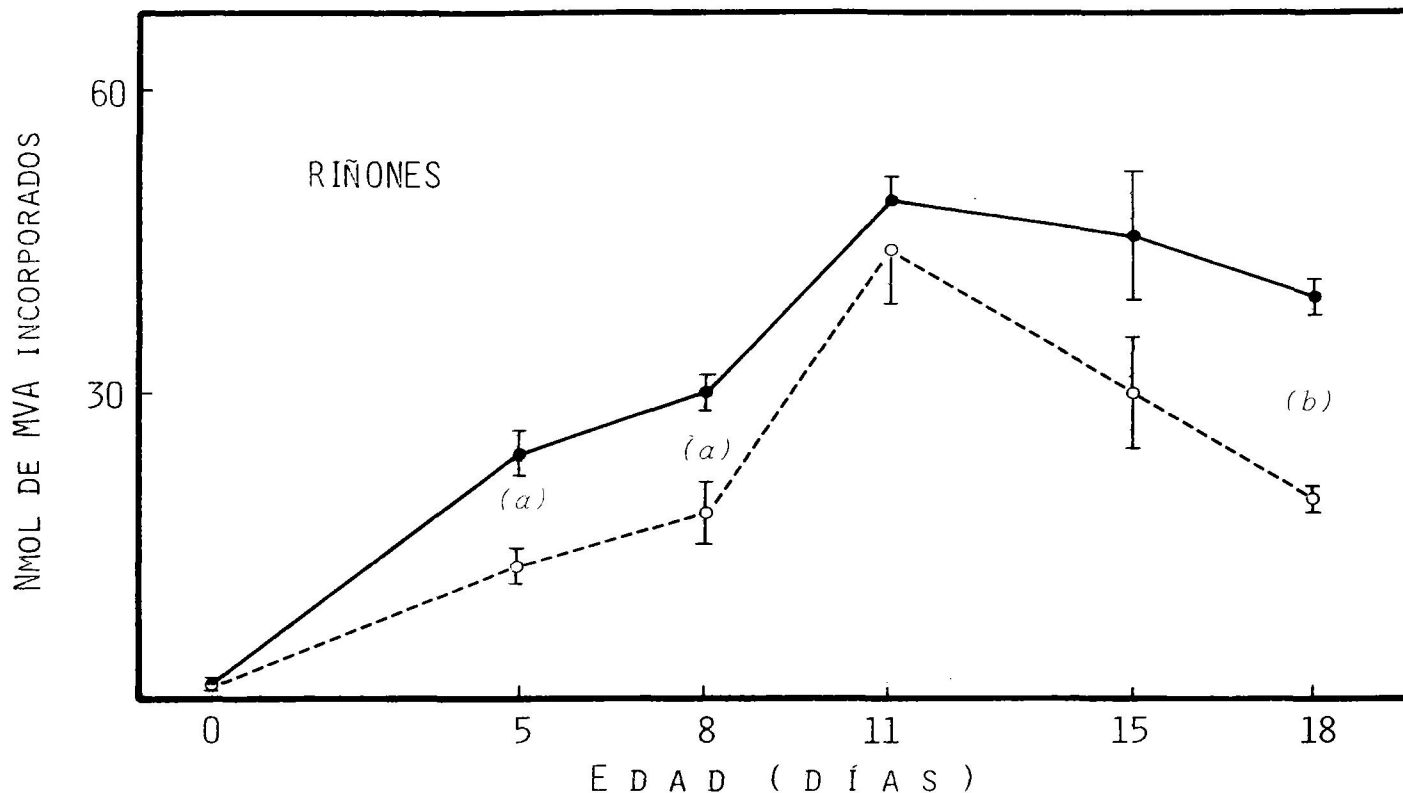


Figura 15. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre la evolución de la incorporación *in vivo* de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables de riñones a lo largo de la edad. Los resultados son la media ± error estándar de la media de tres experimentos. Significación de las diferencias entre valores controles ( ●—● ) y tratados ( ○-----○ ): a, p<0.05; b, p<0.001.

Tabla 36. Variaciones en la incorporación de (2-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos saponificables y a lípidos insaponificables totales por cortes de riñón a lo largo de la edad

Edad (días)	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de MVA incorporados a :	
	LS	LNS
1	2.16±0.47	70.4±1.4
3	4.75±1.02	41.5±3.4
5	2.80±0.97	46.5±4.1
9	2.47±0.81	79.7±8.7
11	1.45±0.60	69.8±3.7
17	2.02±0.45	62.3±9.9

Los valores son la media ± error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

umentan tras la eclosión. Cabe pensar, por consiguiente, en una ganancia pronunciada de la capacidad renal para captar MVA circulante. Precisamente esta capacidad de los riñones de rata se cree que explica el elevado metabolismo renal del MVA "in vivo" (Hellström y col. 1973). Refuerza la hipótesis apuntada la observación, por Cooke y Young (1970, 1973) de un sustancial incremento de la velocidad de filtración glomerular durante la eclosión, que puede ser consecuencia del progresivo aumento de la presión sanguínea que conlleva el proceso (Girard 1965, Van Mierop y Bertuch 1967).

De particular interés fueron las variaciones tras la eclosión de la formación de diversos insaponificables. Como muestra la tabla 37, los riñones parecen aumentar durante los 5 primeros días de vida postnatal su capacidad para la captación y metabolismo del MVA a LNSP (que constituyen un 85.4% del total de insaponificables a los 5 días). Igual que en el hígado, estos insaponificables polares parecen ser mayoritariamente intermediarios de la ruta de síntesis de colesterol localizados tras el lanosterol (véase la tabla 38). Así pues, parece ser que la conversión de los LNSP en colesterol constituye una etapa limitante en los riñones de los pollos de 5-8 días. ¿Quiere esto decir que en los recién nacidos esa etapa no es limitante?. Pensamos que sí lo es, a tenor de los experimentos "in vitro". En estos, la acumulación de LNSP alcanza el 90 y el 75 % en los riñones de pollos de 1 y 4 días, respectivamente, frente a un acúmulo de sólo el 11.5% a los 17 días (tabla 28).

Tabla 37. Variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación *in vivo* de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA a distintos lípidos insaponificables aislados de riñón

Edad (días)	nmol de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
0	0.32 <sup>±</sup> 0.07	0.017 <sup>±</sup> 0.012	0.08 <sup>±</sup> 0.03	0.26 <sup>±</sup> 0.09	1.18 <sup>±</sup> 0.12
5	0.00 <sup>±</sup> 0.00	0.067 <sup>±</sup> 0.042	0.45 <sup>±</sup> 0.12	20.65 <sup>±</sup> 2.20	3.02 <sup>±</sup> 0.18
8	0.00 <sup>±</sup> 0.00	0.080 <sup>±</sup> 0.020	0.65 <sup>±</sup> 0.05	22.36 <sup>±</sup> 0.32	6.38 <sup>±</sup> 1.08
11	2.19 <sup>±</sup> 2.05	1.93 <sup>±</sup> 1.56	5.16 <sup>±</sup> 0.35	18.83 <sup>±</sup> 3.01	20.29 <sup>±</sup> 3.78
15	7.95 <sup>±</sup> 1.06	3.39 <sup>±</sup> 0.43	7.28 <sup>±</sup> 0.71	9.11 <sup>±</sup> 2.82	17.11 <sup>±</sup> 4.46
18	8.97 <sup>±</sup> 0.89	2.05 <sup>±</sup> 0.12	9.56 <sup>±</sup> 0.36	2.98 <sup>±</sup> 0.49	15.97 <sup>±</sup> 1.04

Las diversas fracciones se separaron por cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974). Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos. Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos no saponificables polares.



La conversión de LNSP en colesterol parece activarse en días subsiguientes, pero entonces se hacen más limitantes la transformación de escualeno en lanosterol y la de éste en LNSP (tabla 37). Los resultados "in vitro" coinciden en el sentido de estos cambios (tabla 28). Simultáneamente, el acúmulo de compuestos que migran como ubiquinona se activó ("in vitro" e "in vivo") intensamente. De nuevo, estos compuestos se comportan como derivados de escualeno (tabla 38).

Así pues, en los pollos de 18 días, aparecen en los riñones al menos dos etapas limitantes en la ruta colestero génica, una entre escualeno y lanosterol, la otra entre lanosterol y colesterol.

Las actividades relativas en los pollos de 18 días -y en los más jóvenes- de hígado y riñones difieren totalmente de las existentes en ratas. En los pollos, el hígado metaboliza MVA circulante a insaponificables con una velocidad similar a la de los riñones. La síntesis hepática de colesterol en particular fue incluso doble de la renal. Estos resultados contrastan con los que observamos en cortes de tejido, donde los riñones mostraron una actividad más alta. (De nuevo sugieren estos resultados una forma muy distinta de acceder el MVA a las células renales metabólicamente activas, según se trate de experimentos "in vitro" o "in vivo", y la conveniencia de emplear ambos métodos).

En la rata, la situación es muy distinta. Los riñones, en los experimentos "in vivo", constituyen el principal sitio de metabolismo del MVA circulante por la ruta de esteroides en animales recién nacidos (Wiley y col. 1977a) y en adultos (Fogelman y col.

Tabla 38. Incorporación *in vitro* de diversos derivados marcados del MVA aislados tras la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA de los riñones de pollos controles de 5 días

Producto (% relativo de radiact.)	Sustrato			
	** E	* U	** L	* P
E	8	-	-	-
U	12	11	-	-
L	21	24	42	-
P	35	29	29	62
C	24	36	29	38

Los resultados representan el % de radiactividad encontrado en cada producto tras la incubación con homogenados hepáticos de pollos controles de 18 días (\*) o con homogenados renales de pollos de 5 días de diversos compuestos aislados en riñones 90 minutos después de la inyección i.p. de (5-<sup>14</sup>C)MVA a pollos controles de 5 días. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974).

1975, Edmond y Popják 1974, Edgren y Hellström 1972, Edmond y col. 1976, Wiley y col. 1977a, Wiley y col. 1979, Feingold y col. 1980a). Pero sorprendentemente, "in vitro" la situación, en general, se invierte, obteniéndose mayores actividades en cortes de hígado (Righetti y col. 1976, Bardenheier y Popják 1977, Wiley y col. 1979, Feingold y col. 1980a). Ya hemos comentado que según Raskin y Siperstein (1974), ocurre una u otra cosa dependiendo de la concentración de MVA, predominando el hígado para las más altas, mientras que en el pollo las velocidades máximas aparentes son similares.

Es probable que la distribución de actividades entre las células renales sea distinta en el pollo y la rata. El acceso del MVA "in vivo" en la rata es mayor a los túbulos contorneados que a los glomérulos, mientras que "in vitro" no es así. Si los glomérulos tienen una actividad menor, distorsionan por defecto las medidas "in vitro". Supóngase que en el pollo -donde está por comprobar- la actividad glomerular es mayor. La distorsión sería por exceso.

De lo que no cabe duda, por todo lo que venimos diciendo, es de que los pollos constituyen un modelo de experimentación distinto a las ratas. Lo ya comentado hay que añadirlo a la peculiaridad de los pollos respecto a la mayoría de los mamíferos utilizados como modelos experimentales en cuanto a los tejidos de mayor actividad lipogénica. La lipogénesis en la mayoría de los mamíferos tiene lugar principalmente en el hígado y en el tejido adiposo, sobre todo en este último (Romsos y Leveille 1974). La

síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo casi enteramente en el tejido adiposo del cerdo (O'Hea y Leveille 1969) y algo parecido ocurre en los rumiantes (Hanson y Ballard 1967). Por el contrario, el hígado es el tejido de más activa lipogénesis en el hombre (Shrago y col. 1971). En este sentido -al menos-, el pollo es similar al hombre: aunque su tejido adiposo puede incorporar glucosa y acetato en ácidos grasos (O'Hea y Leveille 1968), la velocidad de lipogénesis es muy superior en el hígado (Goodridge 1968a,b). El hígado también se ha mostrado como el tejido lipogénico más activo en otras aves, como la paloma (Goodridge y Ball 1967), el pato (Evans 1972), el pavo, la codorniz (Shapira y col. 1978), el estornino y el aguanieves blanco (Shah y col. 1978).

Añadamos, para concluir, que aún no se conoce la distribución por órganos del metabolismo del MVA circulante en el hombre. De ahí la conveniencia, por el momento, de no ceñirse a un solo tipo de modelo experimental.

### 3.2.2. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta.

Anteriormente vimos la evolución de los niveles de colesterol séricos y renales en los pollos tras su nacimiento y el efecto que sobre ella produce el enriquecimiento de la dieta con colesterol. El descenso de colesterol sérico tras la eclosión (de un 50% aproximadamente los 9 primeros días) no se corresponde como hemos visto con un incremento de la actividad renal de síntesis de insaponificables a partir de MVA "in vitro", pero sí "in vivo". Por otra parte, el contenido de colesterol de los riñones cambia muy poco.

Ante esta situación, pensamos que el estudio del efecto de la adición de colesterol a la dieta sobre la actividad renal podría ser clarificador, aportando más evidencias, sobre si los cambios perinatales a que nos referimos en el riñón se deben en alguna medida a la depleción del almacén de colesterol en el pollo.

La suplementación de la dieta con colesterol provoca (figura 15) desde los 5 días una inhibición de la producción de lípidos insaponificables del 34.6% (valor medio), debido especialmente a una menor formación de lanosterol y, sobre todo, de colesterol (tablas 37 y 39). La inhibición media de la síntesis de colesterol es del 49.9%. Ya habíamos observado "in vitro" una inhibición de la síntesis de insaponificables desde los 10 días, si bien los resultados referidos a lanosterol y colesterol fueron menos consistentes que los observados ahora.

Las cantidades absolutas de escualeno, LNSP y compuestos con el Rf (en la cromatografía en capa fina) de la ubiquinona no cambian claramente ("in vitro" tampoco) en un sentido determinado en relación a los valores controles. Ni las cantidades absolutas ni las proporciones relativas de los distintos insaponificables formados varían por causa de la dieta en el sentido de recuperar los valores de los pollos más pequeños.

El claro efecto de la ingesta de colesterol sobre la síntesis renal de insaponificables se refuerza, insistimos, por las observaciones realizadas previamente "in vitro". La inhibición parece ser "in vivo" tan rápida (si no más) como la hepática, quizás debido al sistema venoso porta-renal de los pollos. Pero

Tabla 39. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre las variaciones a lo largo del desarrollo postnatal del pollo de la incorporación *in vivo* de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA a distintos lípidos insaponificables aislados de riñón

Edad (días)	nmol de (R)-MVA incorporados a compuestos que migran como:				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	LNSP	Colesterol
5	0.03 <sup>±</sup> 0.03	0.015 <sup>±</sup> 0.007	0.29 <sup>±</sup> 0.07	11.09 <sup>±</sup> 1.79 <sup>b</sup>	2.03 <sup>±</sup> 0.31 <sup>b</sup>
8	0.00 <sup>±</sup> 0.00	0.038 <sup>±</sup> 0.027	0.45 <sup>±</sup> 0.23	15.34 <sup>±</sup> 2.28 <sup>a</sup>	2.74 <sup>±</sup> 0.45 <sup>b</sup>
11	7.64 <sup>±</sup> 2.52	4.22 <sup>±</sup> 0.70	6.66 <sup>±</sup> 0.66	13.43 <sup>±</sup> 4.03	12.58 <sup>±</sup> 2.12
15	7.19 <sup>±</sup> 2.54	2.81 <sup>±</sup> 0.64	3.27 <sup>±</sup> 0.65 <sup>b</sup>	7.35 <sup>±</sup> 0.98	8.42 <sup>±</sup> 1.39
18	3.31 <sup>±</sup> 0.95 <sup>b</sup>	2.31 <sup>±</sup> 0.47	2.76 <sup>±</sup> 0.22 <sup>e</sup>	6.42 <sup>±</sup> 1.78	4.69 <sup>±</sup> 0.16 <sup>c</sup>

Las diversas fracciones se separaron por cromatografía en capa fina según el sistema de Raskin y Siperstein (1974). Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos. Entre paréntesis se muestra el porcentaje medio de cada fracción frente al total de lípidos insaponificables. LNSP= lípidos insaponificables polares. Significación de las diferencias con los correspondientes valores controles (tabla 37): a, p<0.1; b, p<0.05; c, p<0.01; e, p<0.0001.

Las características de la inhibición son muy distintas: en los riñones no aparece con el carácter secuencial con que lo hacía en el hígado, que conducía en último término a una mayor acumulación de escualeno y LNSP.

De todo lo anterior (experiencias "in vivo" e "in vitro", influencia de la ingesta de colesterol) sale reforzada la hipótesis de que los cambios postnatales exhibidos "in vivo" por el riñón no se deben principalmente al agotamiento del colesterol almacenado por el pollo, sino a la progresiva capacitación renal para captar el MVA circulante.

3. Cambios en la actividad de la ruta cetogénica del mevalonato tras la eclosión: efecto de la ingestión de colesterol.

Las medidas de la espiración de  $^{14}\text{CO}_2$  procedente del (5- $^{14}\text{C}$ )MVA (tabla 40) dieron unos valores semejantes en todas las edades estudiadas, salvo a los 5 días, donde fueron el doble de altos. En los experimentos "in vitro" (tabla 41) ocurrió algo similar tanto en hígado como en riñón -aunque con actividades casi 100 veces superiores en el último- pero los valores máximos se obtuvieron en pollos de 7 días, seguidos por los de 4 días. Discutiremos estos perfiles de actividad, en principio sorprendentes, más adelante.

El efecto de la ingestión de colesterol fue tremendamente sugestivo (tablas 40 y 41). "In vivo" se apreció una ligera activación, poco significativa, de la actividad de la ruta cetogénica. Pero los resultados más claros se obtuvieron "in vitro". Los cortes de los hígados procedentes de pollos alimentados con una dieta enriquecida con un 2% de colesterol mostraron una actividad muy superior (en los de 10-15 días, aproximadamente el triple) a los de los controles. En riñón, en cambio, observamos una activación (de más del 100%) significativa sólo a los 4 días (resultados que fueron corroborados posteriormente con otro lote de pollos). Mientras tanto, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (1- $^{14}\text{C}$ )acetato no se afectó.

¿Cuál puede ser el sentido de esas activaciones?

En el caso del hígado, podría sugerirse que una activación (por efecto del colesterol dietario) de la ruta cetogénica serviría para desviar el flujo de metabolitos de la ruta colesterogénica.



Tabla 40. Evolución de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA -por la ruta cetogénica- *in vivo* a lo largo de la edad. Efecto del colesterol en la dieta

Edad (días)	$^{14}\text{CO}_2$ (nmol)	
	Controles	+2% col.
0	13.3 $\pm$ 3.3	-----
5	27.0 $\pm$ 2.1	33.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
8	13.8 $\pm$ 1.7	19.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
11	11.0 $\pm$ 1.9	14.1 $\pm$ 2.7
15	13.3 $\pm$ 1.3	14.6 $\pm$ 3.1
18	11.7 $\pm$ 2.9	18.4 $\pm$ 2.4

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos. Significación de las diferencias entre valores controles y tratados: a,  $p < 0.1$ ;  $p(0/5 \text{ días controles}) < 0.014$ ;  $p(5/8 \text{ días controles}) < 0.003$ .

Tabla 41. Efecto de la adición de un 2% de colesterol a la dieta sobre la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$  -mediante la ruta cetogénica- por cortes de hígado y de riñón

Edad (días)	Producción de $\text{CO}_2$ ( $\text{nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )					
	Hígado			Riñones		
	Controles	+2% col.	p<	Controles	+2% col.	p<
1	0.177 $\pm$ 0.018	-----	---	14.9 $\pm$ 3.1	-----	---
4	0.264 $\pm$ 0.082	0.591 $\pm$ 0.132	0.11	18.0 $\pm$ 2.6	39.2 $\pm$ 2.7	0.040
7	0.394 $\pm$ 0.040	0.571 $\pm$ 0.033	0.028	25.0 $\pm$ 4.7	22.4 $\pm$ 3.0	0.68
10	0.153 $\pm$ 0.037	0.448 $\pm$ 0.061	0.015	13.3 $\pm$ 4.9	14.9 $\pm$ 3.4	0.80
15	0.140 $\pm$ 0.020	0.526 $\pm$ 0.121	0.088	14.5 $\pm$ 2.5	14.5 $\pm$ 1.9	0.99

Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos.

Una alternativa es que la activación sea un efecto indirecto, debido a una inhibición de la preniltransferasa que cataliza la formación de geranilpirofosfato, la cual daría lugar a un acúmulo de isopentenil-PP y dimetilalil-PP. Esta inhibición la sugiere el hecho de que la incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales (que incluyen a los compuestos de la ruta de esteroides a partir del escualeno) se inhibe "in vitro" desde los 4 días -si bien significativamente sólo a partir de los 7- e "in vivo" desde los 8 días, mientras que la actividad PPMVA descarboxilasa sólo comienza a inhibirse a los 11 días (González-Pacanoska 1983), lo que apunta claramente a la existencia de al menos una actividad enzimática entre isopentenil-PP y escualeno que disminuye.

Otra posibilidad, no incompatible con las anteriores, es que los cambios de actividad de la ruta cetogénica sirvan como un mecanismo de control de la síntesis de isopentenil adenosina, que diverge de la ruta esteroidogénica en el mismo punto. Recientemente, LaPorte y col. (1984) han resaltado la interdependencia de las actividades de las enzimas que, en un punto de bifurcación, compiten por un mismo sustrato. Lo cual da lugar a un "efecto de punto de ramificación" que puede proporcionar, aun siguiendo las diversas enzimas la cinética de Michaelis-Menten, desde una ultrasensibilidad a la variación de algún parámetro equivalente a la de una enzima alostérica con un coeficiente de Hill de 8 o más, hasta una subsensibilidad, pasando por una sensibilidad hiperbólica (de Michaelis-Menten). Que ocurran unas cosas u otras depende de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y velocidad máxima) de las enzimas com-

petidoras, de la velocidad de producción del sustrato común y del mecanismo regulador implicado. Lamentablemente, en el caso de la ruta de esteroides y sus ramificaciones, tales parámetros no se conocen... y mientras esto no suceda, poco más se puede decir acerca de la regulación fisiológica de todas ellas.

La activación renal por el colesterol ingerido a los 4 días la discutiremos, como las variaciones debidas a la edad, más adelante. La ausencia de influencia de la dieta sobre la actividad renal en pollos de más edad señala a los tejidos extra-renales -el hígado, como hemos comprobado, y quizá algún otro- como responsables del aumento de actividad de la ruta cetogénica "in vivo" causado por el colesterol.

### III. OTROS ESTUDIOS.

#### 1. Suministro neonatal de colesterol como factor antihipercolesterolémico. Hipótesis de Reiser.

Hemos tenido ocasión de comprobar que el colesterol suministrado en la dieta a pollos de poca edad remodela el balance del recambio de colesterol: aumentan los niveles de éste, disminuye su síntesis (bajando la actividad de varias etapas) y, probablemente, se favorece su excreción. La respuesta del animal parece tocar los resortes necesarios para que el nivel de colesterol aumente lo menos posible.

Sin embargo, se sabe que esa capacidad tamponante no es todo lo eficaz que quisiéramos, y que la hipercolesterolemia es un factor de riesgo de gran importancia en la aparición de aterosclerosis. Recientemente se ha demostrado que el mayor riesgo lo supone el colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL, IDL y VLDL), mientras que el que forma parte de HDL ejerce un efecto protector, de manera que puede utilizarse como un índice de potencial aterogénico la relación de la cantidad de colesterol ligada a las primeras y a las últimas.

Por desgracia, la capacidad de respuesta del organismo frente a la agresión que representa la ingestión de colesterol disminuye conforme envejece. Es bien sabido que las actividades hepáticas de síntesis y degradación de colesterol son mucho menores en las ratas viejas que en las jóvenes, tanto "in vitro" como "in vivo" (Rosenman y Shibata 1952, Bloch y col. 1946, Trout y col. 1962, Yamamoto y Yamamura 1971, Story y Kritchevsky 1974, Uchida y col. 1978, Stange y Dietschy 1984). Pero lo grave de esos cambios es que dan por

resultado un aumento de la colesterolemia y, lo que es peor, una elevación del índice colesterol-LDL/colesterol-HDL. Quizá una de las alteraciones más peligrosas con el paso del tiempo sea que la retroinhibición de la síntesis se va haciendo menos efectiva (Takeuchi y col. 1976). ¿Cómo se podría atenuar esa pérdida de agilidad en la respuesta del organismo?

Reiser y Sidelman (1972) encontraron que las ratas machos que ingerían altos niveles de colesterol durante cierto tiempo antes del destete tenían menores niveles de colesterol sérico en la madurez. Sugirieron que se desarrollaba en alto grado el mecanismo de retroinhibición que implica al colesterol exógeno, y que en épocas posteriores de la vida este mecanismo inhibía con especial efectividad la síntesis de colesterol. Hahn y Kirby (1973) demostraron que la administración de una dieta rica en grasas a ratas prematuramente destetadas evitaba la elevación del colesterol sérico que aparece en ratas de 254 días que se destetan antes de tiempo con una dieta estándar o rica en glúcidos. Posteriormente, Hahn y Koldovsky (1976) observaron que cuanto mayor era la colesterolemia durante el destete, menores se hacían los niveles de colesterol en ratas adultas alimentadas con una dieta aterogénica.

Sin embargo, diversos estudios clínicos no han conseguido demostrar la adquisición de este mecanismo adaptativo por ingesta precoz de colesterol en los niños (Glueck y col. 1972, Friedman y Goldberg 1975, Darmady y col. 1972, Hodgson y col. 1976, Farris y col. 1982), aunque otros detectan diferencias a largo plazo en los niveles de colesterol según que el niño tome leche materna o una leche adaptada (Ziegler y col. 1980, Marmot y

col. 1980). Glueck y Tsang (1972) llamaron la atención sobre los beneficios de una alta ingesta precoz de colesterol en niños con hipercolesterolemia. Para Fomon (1974), un contenido de colesterol moderado o bajo en la comida es incluso necesario para conseguir un adecuado recambio del colesterol en la vida adulta.

La falta de coincidencia entre algunos de los resultados obtenidos tanto en humanos como en ratas podría explicarse (Glueck y col. 1972, Hahn y Koldovsky 1976) por diferencias en los diseños experimentales, sobre todo en cuanto al momento de la ingesta precoz de colesterol y a las duraciones del período de tal ingesta y de la propia vida del individuo.

Pero esta explicación parece no ser adecuada si hacemos caso de los trabajos más recientes, que refutan la hipótesis de Reiser... en las ratas (Kris-Etherton y col. 1979, Green y col. 1981, Hulbron y col. 1982). No obstante, está demostrado que las ratas no son un animal de experimentación óptimo para los estudios sobre hipercolesterolemia y aterosclerosis, debido a su gran resistencia a desarrollar hipercolesterolemia inducida por la dieta (Takeuchi y col. 1976, Narayan y Calhoun 1976, Connor 1968, Kritchevsky 1974, Wilson 1962, Chandler y col. 1979), causada por su gran capacidad de respuesta mediante la excreción de ácidos biliares.

Pocas investigaciones se han realizado con otros animales que parecen más idóneos para este tipo de estudios. Se sabe que los cobayas que en el período neonatal ingieren colestiramina mantienen permanentemente niveles bajos de colesterol sérico (Li y col. 1979, Li y col. 1980, Hassan y col. 1981), una ex-

creción de esteroides incrementada y otros cambios en el metabolismo del colesterol (Hassan y col. 1981). En los babuinos, que, como los humanos, responden con un aumento moderado del colesterol sérico al colesterol dietario (McGill y col. 1976), la ingesta precoz de colesterol provoca en los adultos de 4-6 años una inversión en la respuesta de los niveles de colesterol-HDL a las grasas saturadas en relación a las insaturadas, pero no disminuye la colesterolemia ni se altera la relación colesterol-LDL/colesterol-HDL, aunque no se ha probado el efecto de la dieta rica en colesterol en los adultos (Mott y col. 1982). Este último inconveniente lo tiene también un estudio realizado en conejos (Whatley y col. 1981), en el que se llega a la conclusión de que los adultos que habían tomado leche rica en colesterol tienen los mismos niveles séricos de éste que los controles.

Así, pues, la hipótesis de Reiser sigue siendo controvertida. En vista que no se han realizado estudios sobre el posible efecto protector de la ingesta precoz de colesterol sobre la respuesta al colesterol dietario del adulto en animales en los que es relativamente fácil inducir con la dieta hipercolesterolemia y aterosclerosis, como el conejo (Ho y Taylor 1968), el cobaya (Ostwald y Shannon 1964, Green y col. 1976, Sablé-Amplis y Sicart 1982), el gerbil (Andersen y Holub 1982) o el pollo (Chandler y col. 1979, Wong 1975), creemos de interés, tras establecer el claro efecto de la ingesta neonatal de colesterol sobre su contenido y las actividades relacionadas con su síntesis, hacer un estudio preliminar en esta última especie.



Para ello, sometimos a un lote de pollos durante la primera semana después de la eclosión a una dieta con un alto contenido en colesterol (un 5%). Posteriormente le suministramos una dieta estándar durante 3 semanas, período durante el cual los pollos deberían equiparar sus parámetros metabólicos relacionados con el colesterol a los pollos controles. En ese momento, se volvió a dar a los pollos comida con un 2% de colesterol. La interrogante es ¿hay diferencia entre la respuesta de los pollos controles y la de los precondicionados?

Los parámetros bioquímicos con que rastreamos el efecto de los tratamientos fueron los niveles de colesterol libre y esterificado en suero y en sus fracciones de alta (HDL) y baja (VLDL, IDL y LDL) densidad. Su medida dejó bien patente que a los 15-23 días de edad el colesterol sérico de los pollos precondicionados había recuperado los valores normales. A los 29 días iniciamos el tratamiento de adición de un 2% de colesterol a la dieta.

Los resultados, sin ser espectaculares, resultan de gran interés (véase la figura 16 y la tabla 42): el colesterol sérico total y -lo que es más importante- el índice de potencial aterogénico 'colesterol (LDL-VLDL)/colesterol (HDL)' se elevan menos tras el suministro de colesterol en los pollos que recién nacidos estuvieron expuestos a una dieta enriquecida en este lípido.

En cuanto a las actividades colesterogénicas y de la ruta cetogénica del MVA en hígado y riñones (tablas 43-45), no se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos de pollos. La actividad HMG-CoA reductasa, en concreto, fue casi

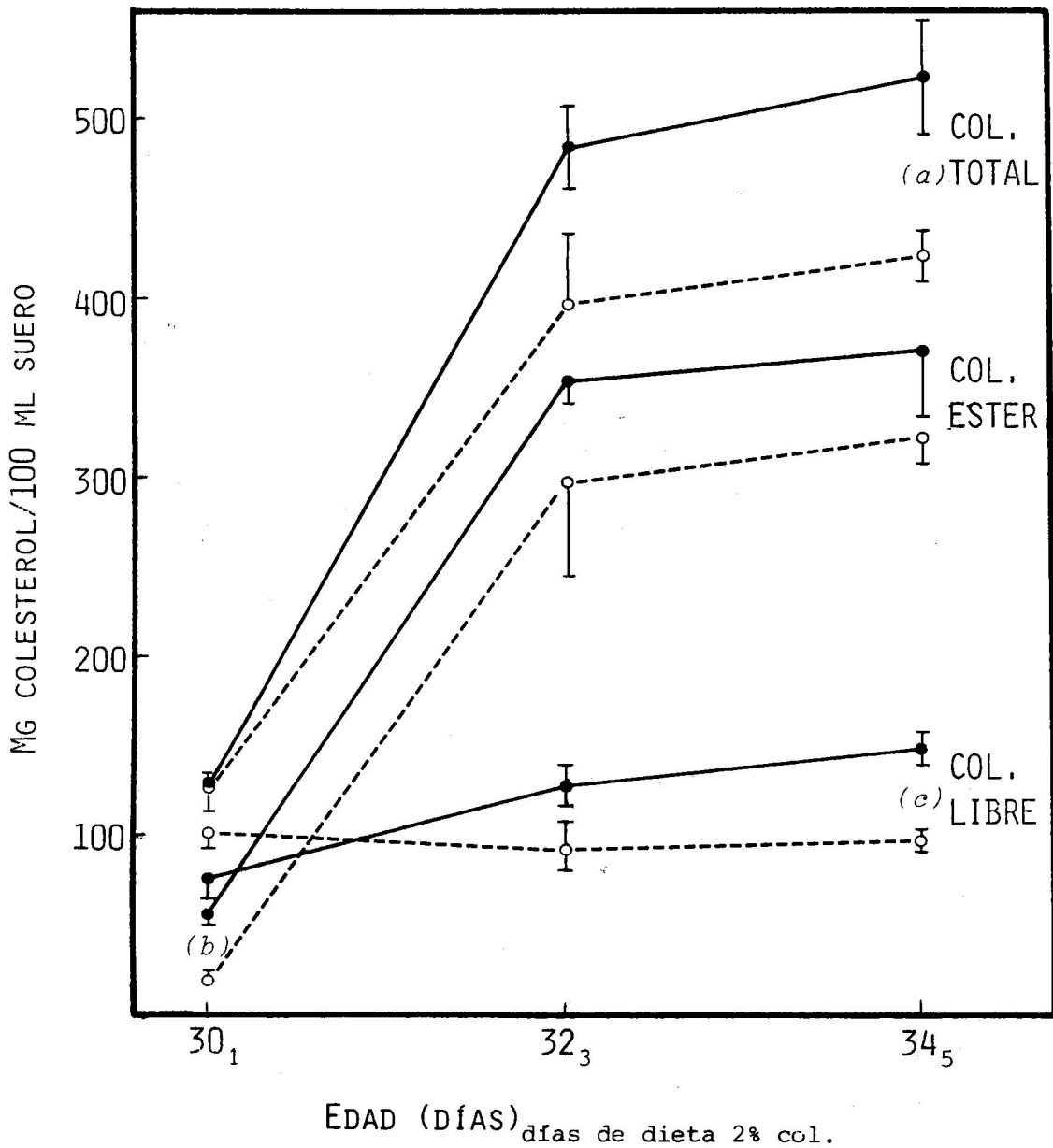


Figura 16. Influencia del tratamiento precoz con una dieta con un 5% de colesterol sobre el contenido sérico de colesterol tras la adición a la dieta de pollos de un mes de un 2% de colesterol. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en tres experimentos, salvo los controles de 34 días (cuatro exp.). Significación de las diferencias entre controles ( ●—● ) y pretratados ( ○- - -○ ): a,  $p < 0.1$ ; b,  $p < 0.05$ ; c,  $p < 0.01$ .

Tabla 42. Influencia del pretratamiento con un 5% de colesterol sobre el contenido de colesterol de las lipoproteínas de alta (HDL), baja y muy baja densidad (LDL-VLDL) tras la adición a la dieta de pollos de un mes de un 2% de colesterol

Edad (días)	Días 2%col.	Pollos	mg col-HDL/100 ml			mg col(LDL-VLDL)/100 ml			<i>i</i>
			Total	Libre	Ester.	Total	Libre	Ester.	
32	3	Controles	142 <sup>±</sup> 3	70 <sup>±</sup> 1	83 <sup>±</sup> 2	329 <sup>±</sup> 23	56 <sup>±</sup> 11	272 <sup>±</sup> 12	2.10 <sup>±</sup> 0.16
		Pretrat.	155 <sup>±</sup> 21	74 <sup>±</sup> 4	98 <sup>±</sup> 23	231 <sup>±</sup> 50	23 <sup>±</sup> 13	208 <sup>±</sup> 42	1.39 <sup>±</sup> 0.28
		p<	0.56	0.37	0.60	0.16	0.13	0.22	0.097
34	5	Controles	155 <sup>±</sup> 6	89 <sup>±</sup> 13	59 <sup>±</sup> 11	367 <sup>±</sup> 37	60 <sup>±</sup> 16	307 <sup>±</sup> 51	2.40 <sup>±</sup> 0.29
		Pretrat.	137 <sup>±</sup> 9	74 <sup>±</sup> 3	63 <sup>±</sup> 10	283 <sup>±</sup> 22	25 <sup>±</sup> 9	258 <sup>±</sup> 21	2.11 <sup>±</sup> 0.31
		p<	0.15	0.31	0.78	0.14	0.14	0.48	0.54

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos, salvo en el caso de los controles de 34 días (4 exp.).

*i* = col-(LDL-VLDL) / col-(HDL).

Tabla 43. Influencia del tratamiento precoz de los pollos con un 5% de colesterol en la dieta sobre la actividad de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables por cortes de hígado y de riñón tras la adición de un 2% de colesterol a la dieta de pollos de 34 días

Edad (días)	Días 2% col	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de MVA incorporados por cortes de:					
		Hígado			Riñón		
		Controles	Pretrat.	p<	Controles	Pretrat.	p<
35	1	45.4 <sup>±</sup> 14.7	50.3 <sup>±</sup> 2.5	0.78	72.6 <sup>±</sup> 9.6	96.6 <sup>±</sup> 6.9	0.12
36	2	37.1 <sup>±</sup> 4.0	29.0 <sup>±</sup> 3.0	0.19	78.6 <sup>±</sup> 16.4	61.9 <sup>±</sup> 1.8	0.42
44	10	21.2 <sup>±</sup> 3.5	16.4 <sup>±</sup> 0.8	0.25	52.4 <sup>±</sup> 4.0	40.5 <sup>±</sup> 2.7	0.069

Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

Tabla 44. Influencia del tratamiento precoz de los pollos con un 5% de colesterol en la dieta sobre la respuesta de la actividad de la ruta cetogénica de hígado y de riñón a la ingesta de colesterol (2%) a los 34 días

Edad (días)	Días 2% col	Producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) por cortes de					
		Hígado			Riñón		
		Controles	Pretrat.	p<	Controles	Pretrat.	p<
35	1	0.41 $\pm$ 0.14	0.45 $\pm$ 0.17	0.9	12.2 $\pm$ 4.0	12.6 $\pm$ 2.6	0.95
36	2	0.41 $\pm$ 0.14	0.34 $\pm$ 0.10	0.8	10.5 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.6	0.03
44	10	0.81 $\pm$ 0.21	0.76 $\pm$ 0.18	0.9	10.9 $\pm$ 2.8	10.1 $\pm$ 3.8	0.89

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

Tabla 45. Influencia de la adición de un 5% de colesterol a la dieta durante los primeros 8 días de vida sobre la respuesta posterior de la ruta cetogénica medida *in vivo* a la ingesta de colesterol

Edad (días)	Días 2% col	Producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA (nmol)		p<
		Controles	Pretratados	
0		5.96 $\pm$ 0.05		
9		4.90 $\pm$ 1.37	6.35 $\pm$ 0.46	0.36
15		2.79 $\pm$ 0.26	5.28 $\pm$ 0.26	0.0006
23		4.50 $\pm$ 0.12	4.69 $\pm$ 0.51	0.73
30	1	2.48 $\pm$ 0.41	2.59 $\pm$ 0.16	0.82
32	3	5.11 $\pm$ 0.62	4.26 $\pm$ 1.24	0.57
34	5	6.03 $\pm$ 1.70	6.22 $\pm$ 0.45	0.92

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en 4 experimentos.

idéntica (el día 44, en el que las diferencias resultaron más significativas, la actividad en los pretratados fue un 5% menor en riñón  $-p < 0.565-$  y un 7% mayor en hígado  $-p < 0.304-$ , respecto a los valores controles).

Nuestro estudio preliminar resulta esperanzador en cuanto a la posible realidad de la hipótesis de Reiser, y reclama la necesidad de continuar este tipo de investigaciones en animales fácilmente susceptibles a desarrollar hipercolesterolemia y aterosclerosis. No queremos dejar de destacar el momento vital en el que provocamos el acondicionamiento: inmediatamente después de la eclosión del pollo, cuando normalmente se produce el cambio de un aporte nutritivo principalmente lipídico a una dieta mayoritariamente glucídica, cambio que, recordemos, en los mamíferos viene marcado por el destete.

## 2. Variaciones diurnas en el metabolismo del mevalonato.

Como explicamos anteriormente, nuestro estudio de la regulación post-MVA de la biosíntesis del colesterol y de la actividad de la ruta cetogénica del MVA incluía la investigación sobre la existencia de un ritmo diurno de actividades, puesto que a lo largo del día ocurren en el hígado de los roedores grandes variaciones de actividad HMG-CoA reductasa (Kandutsch y Saucier 1969, Edwards y Gould 1974, Back y col. 1969, Shapiro y Rodwell 1969) y de incorporación de acetato ("in vivo" e "in vitro") a esteroides (Back y col. 1969, Dugan y col. 1972, Edwards y col. 1972, Bortz y Steele 1973). Otro tanto ocurre en el intestino delgado (Shefer y col. 1973).

En nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de esos mismos ritmos diurnos en el hígado y en el intestino de los pollos (Ramírez y col. 1984). En todos los casos, las actividades máximas aparecen hacia la mitad del período de ingesta. En cuanto a los humanos, se ha demostrado la existencia de ritmo en el contenido sérico de MVA y en su excreción urinaria (Kopito y col. 1982), probablemente determinado por los cambios de actividad HMG-CoA reductasa hepática.

Sin embargo, los datos sobre variaciones diurnas del metabolismo del MVA son contradictorios. Bhat y Ramasarma encontraron en el hígado de rata un máximo de actividad a medianoche (coincidente con el de actividad reductasa) en la incorporación de MVA a esteroides, en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (1- $^{14}\text{C}$ )MVA (Bhat y Ramasarma 1977) y, más concretamente, en



La actividad PP-MVA descarboxilasa (Bhat y Ramasarma 1979). Sin embargo, otros autores no han detectado esas variaciones ni en hígado (Slakey y col. 1972, Back y col. 1969, Jabalquinto y Cardemil 1980) ni en riñón (Jabalquinto y Cardemil 1980).

Para conocer la situación en el pollo, ensayamos tanto "in vitro" como "in vivo" el metabolismo del (5-<sup>14</sup>C)MVA por la ruta de esteroides y por la cetogénica -cuyos cambios de actividad a lo largo del día no se habían estudiado aún-. Como hemos dicho, el pollo muestra ritmo diurno en la actividad HMG-CoA reductasa de hígado e intestino (Ramírez y col. 1984), así como en la incorporación de (1-<sup>14</sup>C)acetato tanto "in vitro" como "in vivo" en esos mismos órganos (Arce, comunicación personal). Tales cambios de actividad son aproximadamente paralelos a los que exhibe la producción de calor en los pollos (MacLeod y Jewitt 1984).

Considerando esos hechos, para llevar a cabo la indagación de las variaciones diurnas en la incorporación de MVA se hacía necesario utilizar dosis de este sustrato suficientemente altas para que su actividad específica (relación d.p.m. / nmol) no se modificase apreciablemente por las oscilaciones de los niveles de MVA endógeno. Al mismo tiempo, elegimos una concentración que entrara en la zona de relación lineal 'concentración de MVA/actividad', en previsión de que en el posible ritmo diurno intervengan modulaciones de actividades de tipo alostérico. Con las concentraciones elegidas (0.1 mM de (R)MVA para los experimentos con cortes de tejido, y una dosis de 400 nmol de (R)MVA para los experimentos de inyección intraperitoneal),

se detectarían variaciones de actividad, fuesen o no dependientes de alteraciones de los niveles de enzimas presentes.

Los resultados obtenidos fueron concluyentes y, en esta ocasión, de descripción sencilla: tanto "in vivo" (tabla 46) como "in vitro" (figuras 17 y 18) no se aprecia la existencia de ritmo diurno (ni en hígado ni en riñones) en el metabolismo del MVA por pollos de 16 días, sea por la ruta de esteroides, sea por la ruta cetogénica. Estos hallazgos concuerdan con la observación, en experimentos simultáneos a los nuestros (González-Pacanowska 1983), de la ausencia de variaciones significativas a lo largo del día en las actividades MVA cinasa, P-MVA cinasa y PP-MVA descarboxilasa de hígado y riñón. Todo lo cual no deja de ser sorprendente, ya que otras situaciones metabólicas que alteran la actividad HMG-CoA reductasa (dieta rica en colesterol, ayuno, variaciones hormonales) suelen afectar en el mismo sentido la incorporación de MVA a lípidos insaponificables.

Dado que las cinasas que fosforilan el MVA y la PP-MVA descarboxilasa del hígado del pollo (González-Pacanowska 1983), así como la incorporación de MVA a lípidos insaponificables en hígado y en riñón (figura 8), presentan una cinética de tipo hiperbólico, lo más probable es que la tasa neta de incorporación "in vivo" sea proporcional a la cantidad de MVA disponible, es decir, a la actividad HMG-CoA reductasa hepática.

Tabla 46. Influencia de la hora del día sobre las actividades *in vivo* de las rutas esterologénica y cetogénica a partir de MVA en pollos de 16 días

Hora	Incorpor. a LNS (nmol en 90 min)		Producción de $^{14}\text{CO}_2$ (nmol en 90 min.)
	Hígado	Riñón	
15.00	56.3 $\pm$ 3.3	55.6 $\pm$ 2.2	18.1 $\pm$ 2.6
3.00	67.1 $\pm$ 6.1	49.7 $\pm$ 1.2	15.8 $\pm$ 1.4

Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en cinco experimentos de inyección intraperitoneal de 400 nmol de (R)-(5- $^{14}\text{C}$ )MVA. LNS= lípidos insaponificables. Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 horas.

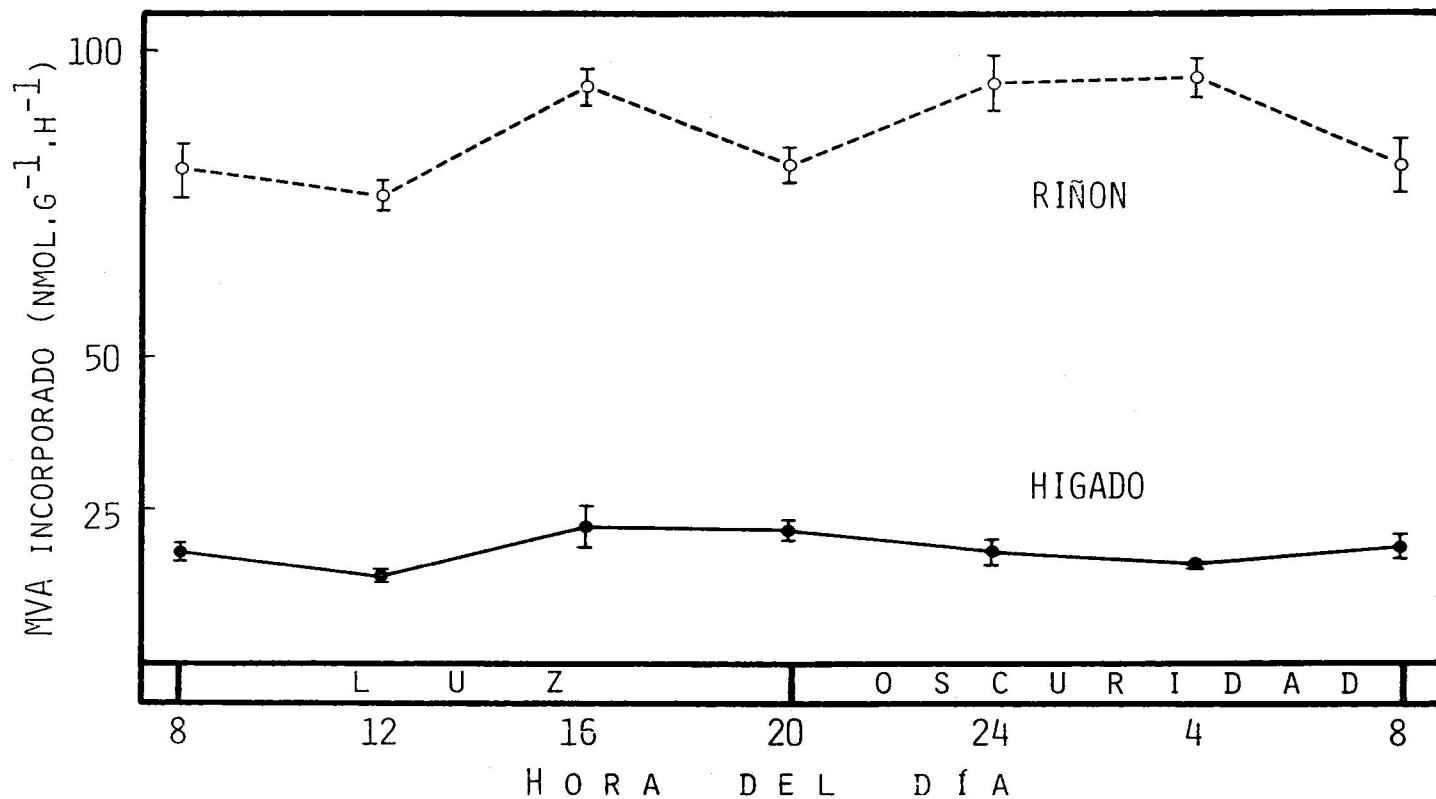


Figura 17. Influencia de la hora del día sobre la incorporación de (5-<sup>14</sup>C)MVA a lípidos insaponificables por cortes de hígado y de riñón de pollos de 16 días. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

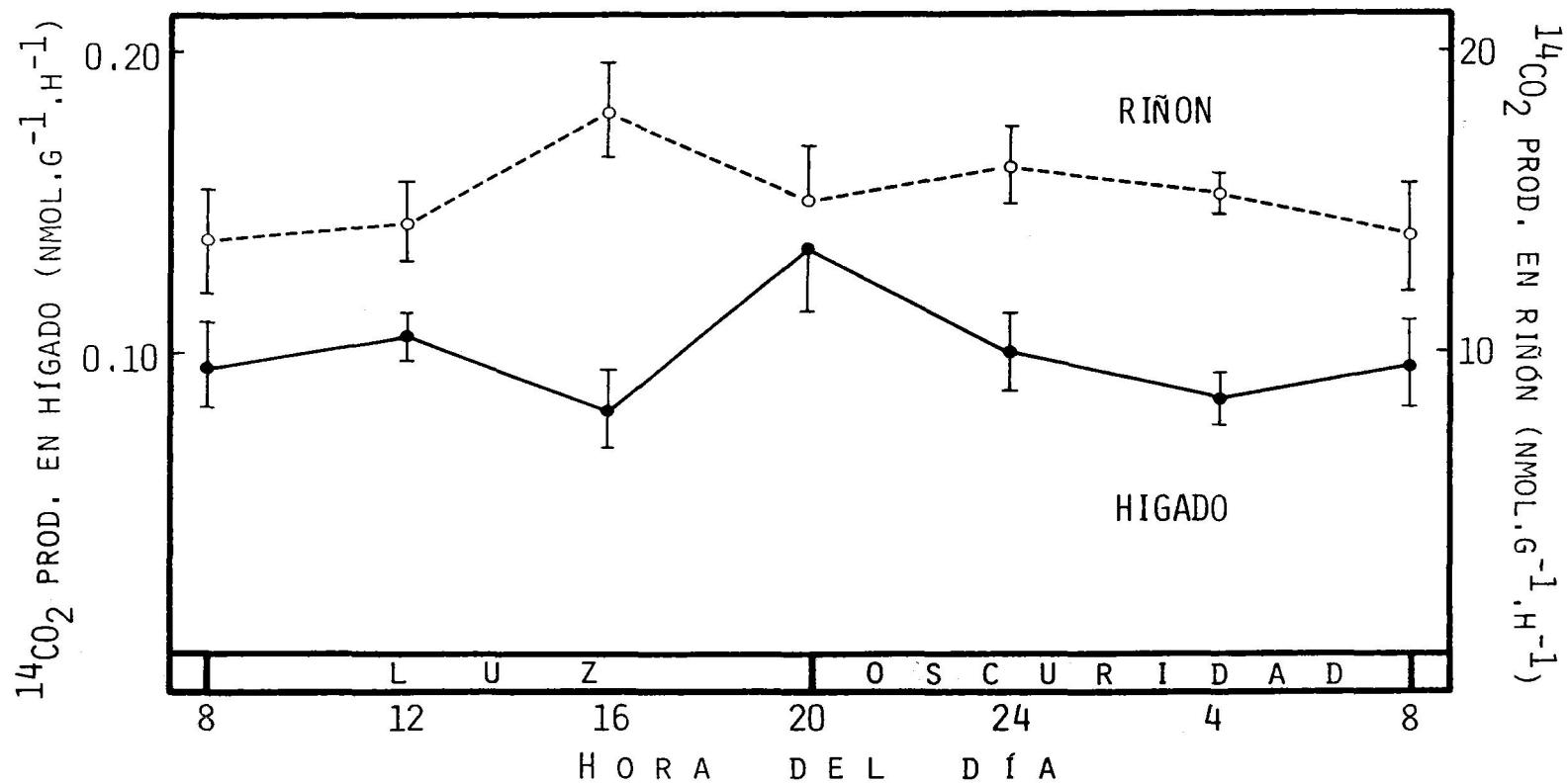


Figura 18. Influencia de la hora del día sobre la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(5\text{-}^{14}\text{C})\text{MVA}$  por cortes de hígado y de riñón de pollos de 16 días. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en tres experimentos.

### 3. Influencia del ayuno sobre el metabolismo del mevalonato,

Desde que en 1974 se descubrió la ruta cetogénica del MVA, se ha avanzado muy poco en el conocimiento de su sentido fisiológico, no obstante haberse mostrado sensible al estado hormonal del animal.

El que la ruta cetogénica regenere HMG-CoA, no en el citosol, sino en el interior de la mitocondria, permite -de ahí la denominación que le damos- la producción de cuerpos cetónicos a partir de MVA. Esto nos sugirió la posibilidad de que la ruta cetogénica del MVA contribuya a la producción de cuerpos cetónicos en determinadas situaciones metabólicas, como el ayuno o la diabetes, en que la producción de aquellos es elevada. Así pues, estudiamos en cortes hepáticos y renales de pollos de 11 días la influencia del ayuno -que aumenta la concentración plasmática de cuerpos cetónicos (Hevia 1979) y cuyos efectos sobre otros aspectos del metabolismo del colesterol se han estudiado en nuestro laboratorio- sobre el metabolismo del MVA.

Los estudios sólo los llevamos a cabo "in vitro" por la complejidad de interpretación de los cambios en el animal íntegro a que puede conducir una situación que conlleva unas adaptaciones drásticas. Ensayamos dos periodos de ayuno: prolongado, de 42 horas, y corto, de 12 horas -ayuno nocturno-. Ya hemos observado (figuras 17 y 18) que en los pollos de 16 días no hay diferencias de actividad al final del periodo oscuro. Sin embargo, pensamos que en pollos de menor edad el almacén de comida en el buche cuando se apaga la luz sería menos cuantioso y podría manifestarse con mayor claridad el efecto de la

inanición nocturna. Por otra parte, para asegurarnos que los pollos no comían durante la noche les retiramos el alimento.

### 3. 1. Efecto de 42 horas de ayuno sobre el metabolismo del mevalonato en hígado y riñones de pollos de 16 días.

Privamos de alimento a los pollos cuando tenían 16 días , a las 21.00 h -momento en que se les apaga la luz-. Las medidas de actividad las realizamos sobre esos pollos cuando llevaban 42 h de ayuno -a las 15.00 h-.

#### 3. 1. 1. Influencia sobre las actividades hepáticas.

La producción a partir de (5-<sup>14</sup>C)MVA de lípidos insaponificables marcados no es significativamente diferente en cortes hepáticos de los pollos sometidos a ayuno en comparación con los controles (figura 19), a pesar de un descenso del 43% en el peso del hígado de los primeros (p= 0.006).

No obstante, se apreció una acumulación de escualeno y compuestos que migran como ubiquinona en la cromatografía en capa fina mucho menos abundante en el hígado de los pollos en ayunas, mientras que la cantidad media de colesterol marcado es mayor (figura 19).

La formación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de (5-<sup>14</sup>C)MVA (tabla 47) es menor en el hígado de los pollos en ayunas pero la diferencia no es significativa (p= 0.59).

Estos resultados concuerdan con los de González-Pacanowska (1983), que observó una inhibición significativa de la PP-MVA descarboxilasa hepática a las 72 h de ayuno, pero no a las 48.

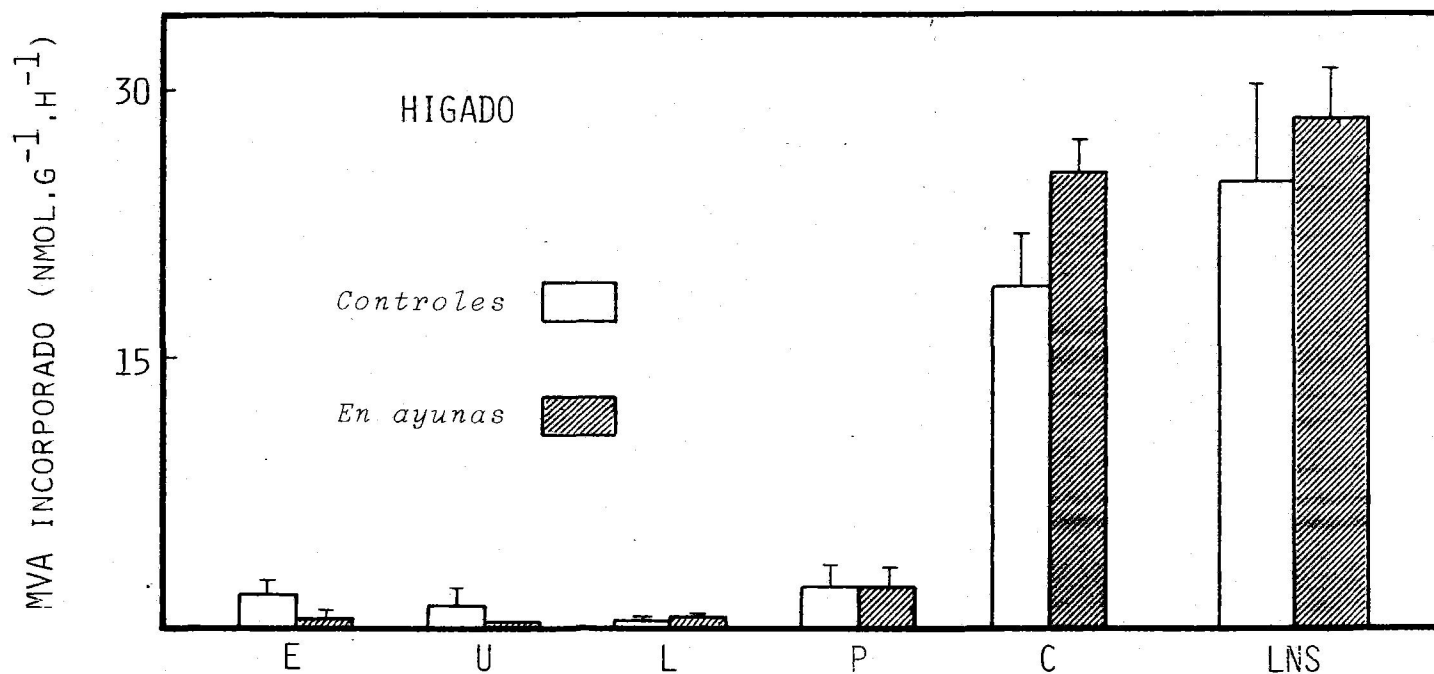


Figura 19. Efecto de 42 horas de ayuno sobre la producción de lípidos insaponificables a partir de MVA por cortes de hígado de pollos de 16 días. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en cuatro experimentos. Significación de las diferencias entre valores 'controles' (barras izdas.) y 'en ayunas' (barras a la dcha.):  $p > 0.1$  en todos los casos. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina. LNS= lípidos insaponificables totales.



Tabla 47. Efecto de 42 horas de ayuno sobre la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (1- $^{14}\text{C}$ )acetato y de (5- $^{14}\text{C}$ )MVA por cortes de hígado y de riñón de pollos de 16 días

Sustrato	Producción de $^{14}\text{CO}_2$ (% respecto a controles)					
	Hígado			Riñón		
	Controles	En ayunas	p<	Controles	En ayunas	p<
(5- $^{14}\text{C}$ )MVA	100 $\pm$ 18	85 $\pm$ 18	0.60	100 $\pm$ 19	162 $\pm$ 16	0.048
(1- $^{14}\text{C}$ )acet.	100 $\pm$ 6	117 $\pm$ 7	0.14	100 $\pm$ 5	90 $\pm$ 8	0.36

Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos cuando se utilizó MVA como sustrato, y de los obtenidos en tres experimentos cuando el sustrato fue acetato.

### 3.1.2. Influencia sobre las actividades renales.

El efecto del ayuno en los riñones (figura 20, tabla 47) fue mucho más pronunciado que en el hígado, a pesar de que aquellos disminuyeron de peso en menor grado (un 13%,  $p=0.53$ ).

Las 42 h de ayuno originaron una clara inhibición (del 58%) de la síntesis de lípidos insaponificables totales a partir de MVA (figura 20). La inhibición es especialmente intensa (del 72%) en el caso particular de la síntesis de colesterol. Las cantidades acumuladas de escualeno y LNSP marcados también son menores en los pollos en ayunas; sin embargo, la gran dispersión de los valores controles hizo que las diferencias no fuesen significativas. Examinando los valores individuales de los pollos controles, observamos que el gran error estándar de la media de esos datos se debía a que en unos pollos se acumulaba mucho escualeno y pocos LNSP marcados, mientras que en otros la situación era la inversa. Esto hace pensar que en el riñón de los pollos probablemente la conversión de derivados oxigenados del lanosterol en colesterol es una etapa limitante, como ya se ha dicho, y que en algunos también lo es la oxidación del escualeno, pero no en otros, por causas que desconocemos de momento. Si se suma la síntesis de escualeno y la de LNSP de cada pollo, resulta un valor (en  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de  $65.3 \pm 2.3$  en los controles y de  $25.6 \pm 2.8$  en los privados de alimento. La diferencia entre ambos valores es significativa con un valor de  $p < 0.00005$ .

De esta forma, nuestros resultados demuestran claramente una inhibición provocada por el ayuno de una o varias enzimas localizadas entre MVA y escualeno (y, tal vez, de una o

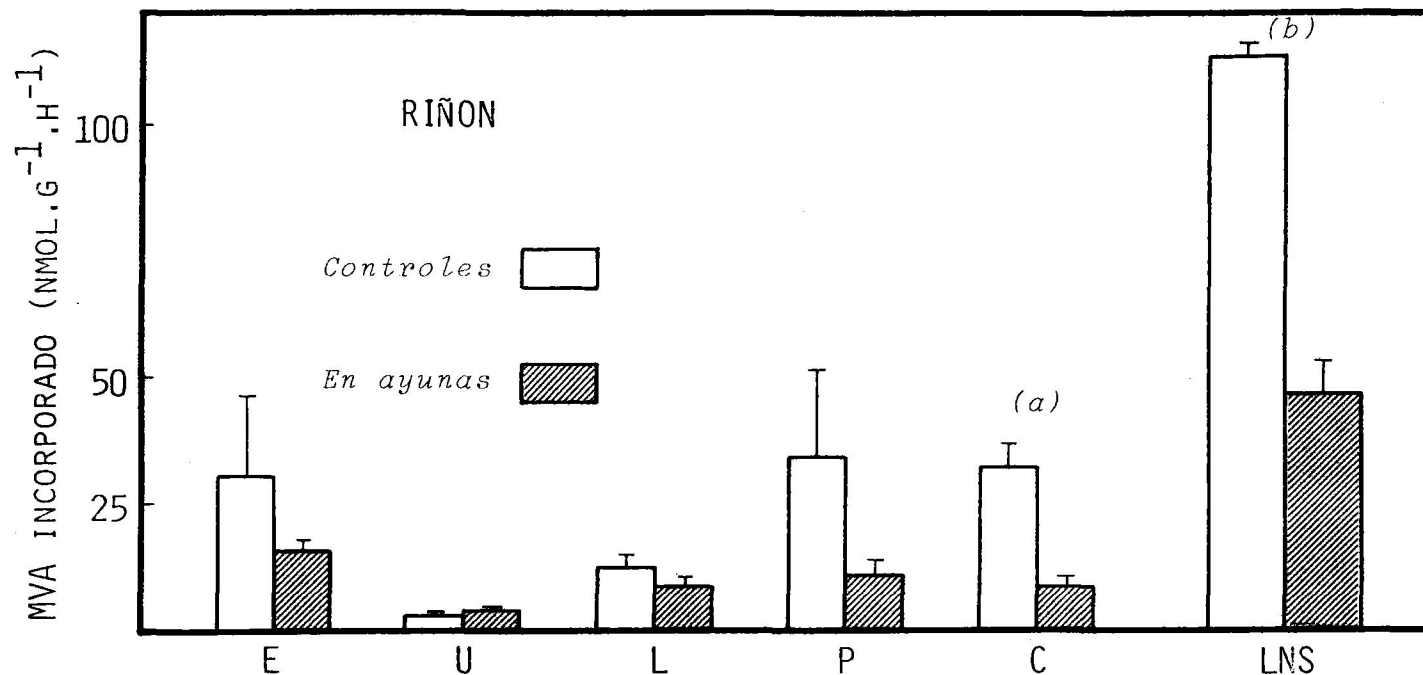


Figura 20. Efectos de 42 horas de ayuno sobre la producción de lípidos insaponificables a partir de MVA por cortes de riñón de pollos de 16 días. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media de los obtenidos en cuatro experimentos. Significación de las diferencias entre valores 'controles' (barras a la izda.) y 'en ayunas' (barras a la dcha.): *a*,  $p < 0.01$ ; *b*,  $p < 0.0005$ . E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en la cromatografía en capa fina. LNS= lípidos insaponificables totales.

varias enzimas posteriores al escualeno) en los riñones.

Por el contrario, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(5\text{-}^{14}\text{C})\text{MVA}$  es en los cortes renales de los pollos inanes un 62% mayor que la de los controles (tabla 47). Como en cortes de los mismos orígenes no hay diferencias en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(1\text{-}^{14}\text{C})\text{acetato}$  ( $p=0.81$ ), es muy probable que esos resultados sean debidos a una mayor actividad de la ruta cetogénica y no del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (recordemos que por la ruta cetogénica se produce  $(1\text{-}^{14}\text{C})\text{acetil-CoA}$  a partir del  $(5\text{-}^{14}\text{C})\text{MVA}$ ).

### 3.2. Efecto de 12 horas de ayuno nocturno sobre el metabolismo del mevalonato en hígado y riñones de pollos de 11 días.

Como dijimos antes, no pudimos demostrar la existencia de ritmo diurno del metabolismo del MVA ni por la ruta de esteroides ni por la cetogénica en pollos de 16 días, tanto en hígado como en riñón, pero es más probable que el ayuno nocturno se deje notar (después de ver el efecto del ayuno en los pollos de 16 días) en pollos más pequeños, con menor capacidad de almacenamiento de comida en el buche.

Efectivamente, a las 9.00 h, tras 12 h de ayuno nocturno, se aprecia en los riñones un cambio del mismo signo que el provocado por la inanición de 42 h (tabla 48). El hígado (tabla 49) volvió a mostrarse insensible a pesar de perder peso -no tan dramáticamente como con las 42 h de ayuno-.

Tabla 48. Producción de lípidos insaponificables a partir de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA por cortes de riñón en varios momentos del día en pollos de 11 días

Producto	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de MVA incorporados por riñón a las			
	15.00	21.00	3.00	9.00
E	30.35 <sup>±</sup> 16.40	4.42 <sup>±</sup> 4.42	21.18 <sup>±</sup> 4.60 <sup>c</sup>	3.04 <sup>±</sup> 0.65
U	2.92 <sup>±</sup> 0.78 <sup>b</sup>	1.01 <sup>±</sup> 1.01	3.03 <sup>±</sup> 0.54 <sup>c</sup>	0.53 <sup>±</sup> 0.21
L	12.50 <sup>±</sup> 3.12	6.03 <sup>±</sup> 4.28	15.90 <sup>±</sup> 4.63 <sup>a</sup>	4.88 <sup>±</sup> 0.29
P	34.96 <sup>±</sup> 17.52	66.50 <sup>±</sup> 18.23	31.95 <sup>±</sup> 6.90	47.35 <sup>±</sup> 11.08
C	31.66 <sup>±</sup> 5.02 <sup>c</sup>	33.25 <sup>±</sup> 8.84	26.39 <sup>±</sup> 8.65 <sup>a</sup>	8.49 <sup>±</sup> 1.33
LNS	112.38 <sup>±</sup> 3.08 <sup>c</sup>	111.21 <sup>±</sup> 2.62 <sup>b</sup>	98.45 <sup>±</sup> 22.50	64.28 <sup>±</sup> 11.73

Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 horas. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Significación de las diferencias con los datos correspondientes a las 9.00 horas, según el test de la t de Student: *a*, p<0.1; *b*, p<0.05; *c*, p<0.01. E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en el sistema cromatográfico de Raskin y Siperstein (1974). LNS= lípidos insaponificables totales.

Tabla 49. Producción de lípidos insaponificables a partir de (R)-(5-<sup>14</sup>C)MVA por cortes de hígado en varios momentos del día en pollos de 11 días

Producto	nmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> de MVA incorporados por hígado a las			
	15.00	21.00	3.00	9.00
E	2.32 <sup>±</sup> 0.10	1.67 <sup>±</sup> 1.49	0.12 <sup>±</sup> 0.07	0.33 <sup>±</sup> 0.26
U	1.64 <sup>±</sup> 1.24	0.02 <sup>±</sup> 0.02	0.00 <sup>±</sup> 0.00	0.00 <sup>±</sup> 0.00
L	0.47 <sup>±</sup> 0.22	0.54 <sup>±</sup> 0.33	0.35 <sup>±</sup> 0.06	0.52 <sup>±</sup> 0.24
P	2.89 <sup>±</sup> 1.55	6.93 <sup>±</sup> 2.64	6.66 <sup>±</sup> 0.78	2.87 <sup>±</sup> 0.86
C	18.79 <sup>±</sup> 3.79	22.10 <sup>±</sup> 2.48	27.81 <sup>±</sup> 7.22	26.03 <sup>±</sup> 8.52
LNS	26.13 <sup>±</sup> 6.99	31.26 <sup>±</sup> 2.08	34.93 <sup>±</sup> 8.05	29.75 <sup>±</sup> 8.14

Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 horas. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Sólo hay diferencias significativas en los valores de 'P' entre las 3.00 y las 9.00 horas (p<0.05). E, U, L, P y C representan compuestos que migran como escualeno, ubiquinona-10, lanosterol, lípidos insaponificables polares y colesterol, respectivamente, en el sistema cromatográfico de Raskin y Siperstein (1974). LNS= lípidos insaponificables totales.

En esta ocasión la inhibición de la síntesis de lípidos insaponificables totales en riñón fue algo menor y la reducción de la formación de colesterol fue del mismo orden que tras 42 h de ayuno (tabla 48, figura 20). Lo que no observamos ahora es el descenso de la producción de escualeno más LNSP.

La activación renal de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  fue incluso mayor que la observada con el ayuno prolongado, de más del 100%, mientras que en hígado no hubo modificaciones significativas de esa actividad (tabla 50).

Con objeto de clarificar la situación del hígado y los riñones tras el ayuno nocturno, decidimos determinar sus contenidos de colesterol, así como el nivel de colesterol sérico, en los mismos cuatro momentos del día elegidos para el estudio anterior.

### 3. 3. Variaciones diurnas de los niveles de colesterol.

#### 3. 3. 1. En hígado.

El nivel de colesterol total es, a las 15.00 h, significativamente menor que a las 21.00 h y a las 9.00 h, en pollos de 11 días. El colesterol libre y el esterificado también se encuentran en menor cantidad a las 15.00 h en comparación con las 9.00 h. A las 3.00 h el contenido de colesterol total y en forma libre es inferior al existente a las 21.00 h y a las 9.00 h (tabla 51).

¿Cómo explicar los valores mínimos de las 15.00 y de las 3.00 h?. Los primeros pudieran deberse a una mayor producción hepática de ácidos biliares durante el período de ingesta. Se ha comprobado que las ratas presentan un ritmo diurno de ac-

Tabla 50. Variaciones a lo largo del día -con 12 h de ayuno nocturno- de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$  en cortes renales y hepáticos

Hora	Producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $(5-^{14}\text{C})\text{MVA}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	
	Hígado	Riñón
15.00	$0.171 \pm 0.032$	$14.4 \pm 2.7^b$
21.00	$0.196 \pm 0.065$	$14.6 \pm 5.1^a$
3.00	$0.243 \pm 0.029$	$13.7 \pm 2.8^b$
9.00	$0.170 \pm 0.026$	$33.0 \pm 3.1$

Los pollos, de 11 días, tenían luz de 9.00 a 21.00 horas. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Significación de las diferencias con los datos correspondientes a las 9.00 h, según el test de la t de Student: *a*,  $p < 0.05$ ; *b*,  $p < 0.005$ .



Tabla 51. Influencia de la hora del día sobre el contenido de colesterol total, libre y esterificado del hígado de los pollos de 11 días

Hora	Colesterol total		Colesterol libre		Colesterol esterif.	
	mg/g	mg/órg.	mg/g	mg/órg	mg/g	mg/órg
15.00	3.07 <sup>±</sup> 0.27	14.20 <sup>±</sup> 0.65	3.06 <sup>±</sup> 0.27	13.82 <sup>±</sup> 1.02	0.01 <sup>±</sup> 0.01	0.06 <sup>±</sup> 0.06
21.00	3.73 <sup>±</sup> 0.02	18.30 <sup>±</sup> 2.19	3.54 <sup>±</sup> 0.19	17.24 <sup>±</sup> 2.43	0.19 <sup>±</sup> 0.18	0.89 <sup>±</sup> 0.85
3.00	3.27 <sup>±</sup> 0.09	13.65 <sup>±</sup> 1.67	3.09 <sup>±</sup> 0.14	13.06 <sup>±</sup> 1.98	0.18 <sup>±</sup> 0.10	0.59 <sup>±</sup> 0.33
9.00	3.79 <sup>±</sup> 0.14	14.05 <sup>±</sup> 0.98	3.61 <sup>±</sup> 0.11	13.42 <sup>±</sup> 0.97	0.18 <sup>±</sup> 0.07	0.63 <sup>±</sup> 0.24

Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 h. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Las diferencias más significativas según el test de la t de Student son las siguientes -se indican entre paréntesis las horas cuyos valores se comparan-:  
 Colest. total: p(15/21)<0.096; p(15/9)<0.057; p(21/3)<0.0025; p(3/9)<0.022  
 Colest. libre: p(15/9)<0.11; p(21/3)<0.11; p(3/9)<0.020  
 Colest. ester: p(15/9)<0.054

Todos los valores de 'p' se han calculado con los datos de mg/l.

tividad colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (la enzima principal en la regulación de la síntesis de ácidos biliares) paralelo al de la actividad HMG-CoA reductasa (Danielsson 1972, Mayer 1976). El mínimo observado se explicaría de predominar temporalmente la actividad hidroxilasa sobre la carboxilasa en el hígado de los pollos. En cuanto al nadir de las 3.00 h, puede deberse al mínimo de actividad HMG-CoA reductasa y colesterologénesis que hay a esa hora (Ramírez y col. 1984).

Los cambios observados son de poca entidad comparados con los que provoca la dieta rica en colesterol. Lo cual puede explicar que, aun si existe relación entre el acúmulo de colesterol y la inhibición del metabolismo hepático del MVA por la ruta de esteroides, no se traduzcan aquellas variaciones en un ritmo diurno apreciable de este metabolismo.

### 3.3.2. En riñones.

En estos órganos sólo cabe destacar un ligero descenso de sus niveles de colesterol entre las 21.00 y las 3.00 h (tabla 52). Quizá sea debido a una menor actividad colesterologénica neta en los riñones a las 3.00 h, derivada del menor aporte de MVA provocado por el nadir de actividad HMG-CoA reductasa hepática (Ramírez y col. 1984).

### 3.3.3. En suero.

Los datos presentados en las tablas 53 y 54 dejan claro que los niveles séricos de colesterol total, libre y esterificado, así como el colesterol total y esterificado transportado en las HDL alcanzan el valor más bajo a las 15.00 h, mientras

Tabla 52 . Influencia de la hora del día sobre el contenido de colesterol total, libre y esterificado de los riñones de los pollos de 11 días

Hora	Colesterol total		Colesterol libre		Colesterol esterif.	
	mg/g	mg/órg.	mg/g	mg/órg.	mg/g	mg/órg
15.00	3.84 <sup>±</sup> 0.31	4.53 <sup>±</sup> 0.86	3.66 <sup>±</sup> 0.24	4.27 <sup>±</sup> 0.74	0.19 <sup>±</sup> 0.08	0.26 <sup>±</sup> 0.13
21.00	4.02 <sup>±</sup> 0.07	4.77 <sup>±</sup> 0.46	3.70 <sup>±</sup> 0.07	4.39 <sup>±</sup> 0.42	0.32 <sup>±</sup> 0.02	0.38 <sup>±</sup> 0.05
3.00	3.34 <sup>±</sup> 0.16	3.53 <sup>±</sup> 0.36	3.17 <sup>±</sup> 0.16	3.34 <sup>±</sup> 0.36	0.17 <sup>±</sup> 0.05	0.17 <sup>±</sup> 0.05
9.00	3.84 <sup>±</sup> 0.17	4.90 <sup>±</sup> 0.24	3.52 <sup>±</sup> 0.11	4.49 <sup>±</sup> 0.23	0.32 <sup>±</sup> 0.10	0.40 <sup>±</sup> 0.12

Los pollos tenían luz de 9 a 21 horas. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos. Las diferencias más significativas según el test de la t de Student son las siguientes -se indican entre paréntesis las horas cuyos valores se comparan-:  
 Colest. total: p(21/3)<0.0081; p(3/9)<0.076

Colest. libre: p(21/3)<0.023

Colest. ester: p(21/3)<0.032

Todos los valores de 'p' se han calculado con los datos de mg/l.

Tabla 53. Influencia de la hora del día sobre el contenido de colesterol total del suero completo y de las fracciones lipoproteicas de alta (HDL), baja y muy baja (LDL-VLDL) densidad en pollos de 11 días

Hora	mg colesterol/100 ml suero			
	Suero completo	HDL	LDL-VLDL	col (LDL-VLDL) /col (HDL)
15.00	163.7 <sup>±</sup> 13.2	112.3 <sup>±</sup> 5.7	51.4 <sup>±</sup> 11.9	0.46 <sup>±</sup> 0.10
21.00	180.1 <sup>±</sup> 3.7	132.4 <sup>±</sup> 8.8	47.7 <sup>±</sup> 7.5	0.37 <sup>±</sup> 0.08
3.00	206.7 <sup>±</sup> 4.8	145.8 <sup>±</sup> 7.7	60.9 <sup>±</sup> 4.4	0.42 <sup>±</sup> 0.05
9.00	197.8 <sup>±</sup> 9.9	133.7 <sup>±</sup> 7.1	64.2 <sup>±</sup> 10.7	0.49 <sup>±</sup> 0.09
	p(15/3)<0.022	p(15/21)<0.10	p>0.1	p>0.1
	p(15/9)<0.085	p(15/3)<0.014		
	p(21/3)<0.0093	p(15/9)<0.058		

Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 horas. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los obtenidos en cuatro experimentos, salvo a las 21.00 h (3 exp.). Se indican las diferencias más significativas según el test de la t de Student (entre paréntesis, las horas cuyos valores se comparan).

Tabla 54. Influencia de la hora del día sobre los mg/100 ml de colesterol libre y esterificado del suero completo y de las fracciones lipoproteicas de alta (HDL), baja y muy baja (LDL-VLDL) densidad en pollos de 11 días

Hora	Suero total		HDL		LDL-VLDL	
	Libre	Esterif.	Libre	Esterif.	Libre	Esterif.
15.00	45.1 <sup>±</sup> 2.5	118.6 <sup>±</sup> 11.8	43.1 <sup>±</sup> 2.6	69.6 <sup>±</sup> 4.7	2.4 <sup>±</sup> 1.5	49.0 <sup>±</sup> 12.1
21.00	49.2 <sup>±</sup> 1.9	130.9 <sup>±</sup> 5.6	41.3 <sup>±</sup> 3.6	91.1 <sup>±</sup> 7.9	7.9 <sup>±</sup> 2.5	39.8 <sup>±</sup> 5.9
3.00	56.6 <sup>±</sup> 1.9	150.1 <sup>±</sup> 3.4	48.9 <sup>±</sup> 3.0	96.9 <sup>±</sup> 6.7	7.7 <sup>±</sup> 3.0	55.7 <sup>±</sup> 4.8
9.00	46.9 <sup>±</sup> 3.1	150.9 <sup>±</sup> 8.0	43.1 <sup>±</sup> 2.6	90.6 <sup>±</sup> 6.0	3.8 <sup>±</sup> 1.5	60.3 <sup>±</sup> 9.4
	p(15/3)<0.012 p(15/3)<0.044		p(15/21)<0.056			
	p(21/3)<0.044 p(21/3)<0.027		p(15/3)<0.017			
	p(3/9)<0.037		p(15/9)<0.034			

Los pollos tenían luz de 9.00 a 21.00 horas. Los valores son la media <sup>±</sup> error estándar de la media de los obtenidos en cuatro experimentos, salvo a las 21.00 h (tres exp.). Se indican las diferencias más significativas según el test de la t de Student (entre paréntesis, las horas cuyos valores se comparan).

que aparecen valores máximos a las 3.00 y a las 9.00 h.

Puesto que los niveles inferiores son simultáneos a los mostrados por el hígado, su interpretación puede ser la misma: el máximo de formación hepática de ácidos biliares hacia la mitad del período de ingesta. En cuanto al mínimo de colesterol-HDL, recordemos que éste es el precursor utilizado preferentemente en la síntesis de ácidos biliares (Halloran y col. 1978) y como fuente de colesterol biliar, al menos en el hombre (Schwartz y col. 1978).

Las variaciones diurnas de los niveles de colesterol en los pollos de 11 días no parecen guardar gran relación con los cambios observados en el metabolismo renal del MVA ni con la casi total ausencia de tales en el hígado. No parece oportuno invocar, por consiguiente, como explicación fundamental de las variaciones diurnas de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables ningún tipo de modulación por retroinhibición.

Más probable nos parece que tanto el ritmo diurno como el efecto del ayuno prolongado en los riñones de pollos de 11 días sean debidos a los cambios hormonales que conllevan tales situaciones. Lo más sorprendente, en ese caso, es que las acciones hormonales ejerzan su acción más rápidamente sobre el riñón que sobre el hígado. Pero los resultados en éste se corroboran con los de González-Pacanowska (1983), quien no observó una inhibición significativa de la PP-MVA descarboxilasa hasta las 72 horas de ayuno. Lo cual contrasta con la rápida (en unas pocas horas) inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa y de la incorporación de acetato a lípidos insaponificables en hígado de po-

llos privados de alimento (Ramírez y col. 1984). ¿Será que las acciones hormonales disparadas por el ayuno ejercen su acción principal en relación con la colescterogénesis, en el hígado a nivel de la reductasa, y, en los riñones (cuya síntesis de colesterol depende del MVA circulante), sobre etapas posteriores de la ruta?.

En la rata, los efectos de la inanición sobre las actividades colescterogénicas hepáticas son más generales. Slakey y col. (1972) demostraron en el hígado de ratas sometidas a 12 horas de ayuno una inhibición de la incorporación de acetato y MVA a lípidos insaponificables totales y a esteroides precipitables con digitonina, y de las actividades HMG-CoA reductasa, PP-MVA descarboxilasa, isopentenil-PP isomerasa, dimetilalil transferasa y escualeno sintetasa; la inhibición de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales a las 48 h de ayuno era del 97%. Ide y col. (1979) también observaron una fuerte inhibición de la incorporación hepática de MVA a insaponificables totales y a esteroides que precipitan con digitonina. Andersen y Dietschy (1977) han descrito un descenso de la incorporación de acetato a esteroides precipitables con digitonina en hígado (principalmente) y riñón a las 48 h de ayuno.

En resumen, las actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo del MVA por la ruta de esteroides son más sensibles al efecto del ayuno en el hígado de la rata que en el del pollo.

Muy pocos estudios se han llevado a cabo sobre la influencia del ayuno en las actividades colestero génicas renales. "In vivo", Wiss y Wiss (1977a) hallaron que la síntesis de colesterol en los riñones de las ratas se reduce notablemente por el ayuno, pero tal efecto no se aprecia en algunos experimentos con cortes renales (Dietschy y Siperstein 1967). Según Jabalquinto y Cardemil (1981a), 48 horas de ayuno inhiben las actividades MVA cinasa, P-MVA cinasa y PP-MVA descarboxilasa de riñón -e hígado, por supuesto- de rata (la última actividad también se inhibe en ambos órganos en la diabetes inducida por estreptozotocina (Jabalquinto y Cardemil 1981a, b)).

No es de extrañar una respuesta de distinta magnitud en los pollos y en las ratas al ayuno, porque el control del metabolismo glucídico y lipídico mediado por insulina y glucagón es diferente en ambas especies (Pearce 1980). El páncreas de los pollos tiene 1-2 mg de insulina por cada 100 g de peso fresco mientras que el de los mamíferos tiene 10-15 mg/100 g (véase Langslow y Hales 1971) y, en cambio, posee 10 veces más glucagón (Vuylsteke y De Duve 1953). Diversos estudios (véase Pearce 1980) sugieren que el glucagón podría desempeñar un papel mayor que la insulina en el metabolismo glucídico y lipídico de los pollos. En la situación que nos interesa -el ayuno-, Langslow y col. (1970) demostraron que, en los pollos, en contraste con los mamíferos, sólo se producen ligeras variaciones de los niveles de insulina plasmáticos, aunque disminuyen los de glucosa y aumentan los de ácidos grasos; además, estos cambios parecen independientes de las pequeñas variaciones de los



niveles de insulina. Así pues, el glucagón puede que tenga mucho más que ver que la insulina en el efecto inhibitor sobre la colesteroogénesis a partir de MVA en riñón.

No se había realizado hasta ahora ningún estudio acerca del efecto del ayuno sobre la actividad de la ruta cetogénica del MVA. Pero interesa saber que la diabetes inducida en las ratas por estreptozotocina -agente que, en cambio, no produce diabetes en los pollos (Langslow y col. 1970)- parece provocar una inhibición, reversible con insulina, de la citada ruta en los riñones y en el animal íntegro (Wiley y Howton 1978, Wiley y col. 1982), resultados aparentemente contradictorios con los nuestros. Sorprendentemente, Wiley y col. (1982) aprecian además una activación de la esterologénesis hepática. Los resultados obtenidos por estos autores en relación a la ruta cetogénica podrían explicarse por una menor producción de  $\text{CO}_2$  a partir de acetil-CoA mitocondrial y no por una menor actividad de la ruta en cuestión. De hecho, Tomera y col. (1983) han demostrado un descenso por efecto de la diabetes de hasta 6 veces en el hígado de las ratas.

En nuestro caso, la producción renal de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato es ligeramente menor (diferencia no significativa) en los cortes renales de los pollos en ayunas en comparación con los controles, por lo que el fuerte incremento de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir del (5- $^{14}\text{C}$ )MVA se debe con toda probabilidad a una mayor actividad de la ruta cetogénica del MVA. De todas formas, como en el caso de la ruta de esteroides, nuestros resultados reclaman un estudio sobre las hormonas que inducen los cambios.

En cualquier caso, la activación de la ruta cetogénica posibilita una más activa formación de cuerpos cetónicos por parte del riñón en una situación en la que son necesarios para el pollo. Ahora bien, desconocemos de momento si el aumento de actividad de la ruta cetogénica del MVA está motivado por una estimulación directa de la propia ruta o, por el contrario, es consecuencia de la inhibición de la ruta de esteroides. Esta podría originar un acúmulo de intermediarios, de manera que la mayor actividad sería producto sencillamente de una mayor disponibilidad de sustrato.

Por último, reparemos que estos efectos del ayuno bien podrían explicar que en los cortes renales, a los 4-7 días, la actividad de la ruta cetogénica sea mayor, y la de la ruta colesterogénica menor, en relación al resto de las edades (figura 12, tabla 41). También el aumento de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por el pollo íntegro a los 4 días (tabla 40) podría ser debido a la misma causa. Recordemos que aquellos experimentos se realizaron siempre a las 9.00 h. En cuanto al efecto de la dieta rica en colesterol sobre la ruta cetogénica renal el 4º día de vida (tabla 41), tal vez sea consecuencia de la interacción de dicha dieta con el ayuno nocturno.

CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

### 1. Características de la ruta colescterogénica del MVA en el pollo.

El metabolismo del MVA circulante por la ruta de esteroides en los pollos tiene lugar sobre todo, y de forma cuantitativamente similar, en el hígado y los riñones.

En el hígado de pollos alimentados con una dieta estándar, el colesterol representa más del 90% de los lípidos insaponificables formados a partir de MVA.

En los riñones, en cambio, se sintetizan en cantidades similares escualeno, lanosterol, colesterol, y lo que parecen ser óxidos de escualeno y derivados oxigenados de lanosterol. Es clara la existencia en los riñones de al menos dos etapas limitantes tras la formación de escualeno, una anterior al lanosterol y otra posterior.

Las velocidades máximas aparentes de la ruta de síntesis de lípidos insaponificables son  $333 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para el hígado y  $195 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para el riñón. La  $K_m$  aparente hepática es 3.46 mM, más de diez veces superior a la renal, 0.332 mM.

### 2. Características de la ruta cetogénica del MVA en el pollo.

Se ha demostrado la existencia de una activa ruta cetogénica del MVA en el pollo. A los 90 minutos de la administración del MVA, al menos el 11% de éste se metaboliza por esa ruta.

En términos absolutos el riñón es, con mucho, el tejido que más MVA circulante conduce hasta cuerpos cetónicos. Destaca la cinética sigmoidal de esta ruta en riñón, por sus posibles implicaciones reguladoras. No obstante, la relación de actividades de las rutas cetogénica y esterologénica es mayor en el encéfalo,

la médula espinal y la piel.

Asimismo hay que señalar la posible importancia de la actividad de la ruta cetogénica hepática, pues dispone del mayor aporte de MVA, sintetizado "in situ".

### 3. Evolución postnatal.

Después de la eclosión, disminuye drásticamente el nivel hepático de colesterol esterificado, a la vez que se incrementa la síntesis de lípidos insaponificables a partir de MVA.

Durante los 5 primeros días se activa sobre todo el metabolismo del MVA a escualeno. Entre los 5 y los 8 días, la conversión de escualeno en derivados polares de lanosterol. Entre los 8 y los 11 días se hace completamente activa la síntesis de colesterol a partir de los últimos.

En los riñones se aprecia un pronunciado aumento de la síntesis de todos los lípidos insaponificables tras la eclosión, que se presume originado por un aumento de la capacidad renal para la captación del MVA circulante.

### 4. Efecto de una dieta con un 2% de colesterol.

La adición de un 2% de colesterol a la dieta provoca un gran aumento del colesterol esterificado en el hígado, un ligero aumento del colesterol total en los riñones, y un incremento del colesterol asociado a las lipoproteínas de densidad baja o intermedia.

En el hígado de los pollos tratados de 5 días tiene lugar, respecto a los pollos controles, un mayor acúmulo de derivados polares del lanosterol formados a partir de MVA, acúmulo que es anterior o simultáneo a la inhibición de la actividad HMG-CoA

reductasa. En la cromatografía en capa fina, tales derivados migran como un grupo de compuestos con una fuerte acción inhibitoria de la actividad reductasa y de la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales, así como con un efecto depresor más débil de la incorporación de MVA a insaponificables.

A partir de los 8 días de dieta se inhibe alguna etapa entre isopentenil-PP y escualeno, además del metabolismo del propio escualeno. Esta última inhibición es especialmente intensa desde los 15 días.

En los riñones se inhibe ligera pero significativamente la producción de lípidos insaponificables, quizá como consecuencia del aporte de colesterol vía el sistema porta-renal característico de las aves.

La actividad hepática de la ruta cetogénica se incrementa por el mayor aporte exógeno de colesterol, lo que sugiere importantes funciones reguladoras de esta ruta, quizá en relación con la actividad de alguna otra ruta colateral de la de síntesis de colesterol, como la de formación de isopentenil-adenosina.

##### 5. Efecto de una ingesta precoz de colesterol.

La ingestión de una dieta con un 5% de colesterol durante la primera semana de vida postnatal parece proteger a los pollitos de un mes frente a la agresión que supone el suministro de un 2% de colesterol, por cuanto aumenta menos que en los controles el índice de potencialidad aterogénica " $\text{colesterol} - (\text{VLDL} + \text{IDL} + \text{LDL}) / \text{colesterol} - (\text{HDL})$ ".

6. Ritmo diurno.

Los pollos de 16 días no exhiben ritmo diurno en el metabolismo del MVA por la ruta de esteroides ni por la cetogénica, tanto en hígado como en riñones.

7. Efecto del ayuno.

Un ayuno de 42 h en pollos de 16 días provoca en los riñones una inhibición del 58% en la síntesis de lípidos insaponificables a partir de MVA, mientras que la actividad de la ruta cetogénica se hace un 62% mayor. Ese mismo período de ayuno apenas indujo cambios en las actividades hepáticas.

El ayuno nocturno de 12 h origina cambios similares en los riñones de los pollos de 11 días. En el hígado de estos pollos no hay variaciones significativas a pesar de las oscilaciones en su contenido de colesterol, con valores máximos al final de los períodos luminoso y oscuro. El mínimo que aparece en la mitad de la fase luminosa coincide con un nadir en el colesterol sérico asociado a las HDL.



## REFERENCIAS



REFERENCIAS

- ADAMS, C.W.M., DAVISON, A.N. (1959). *J. Neurochem.* 4, 282-289.
- AKESTER, A.R. (1971). En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl" (Bell, D.J., Freeman, B.M., eds.) Vol. 1, pp. 783-839. London y New York.
- ALEJANDRE, M.J. (1980). Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- ALEJANDRE, M.J., RAMIREZ, H., SUAREZ, M.D., GARCIA-PEREGRIN, E. (1981). *Biol. Neonate* 40, 232-236.
- ANDERSEN, C.B., HOLUB, B.J. (1982). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 885-892.
- ANDERSEN, G.E., FRIIS-HANSEN, B. (1977). *Acta Paediatr. Scand.* 66, 355-360.
- ANDERSEN, J.M., DIETSCHY, J.M. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 3646-3651.
- ANDERSEN, J.M., DIETSCHY, J.M. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 9024-9032.
- ANDERSEN, J.M., TURLEY, S.D., DIETSCHY, J.M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 165-169.
- APFLEBAUM-BOWDEN, D., HAFFNER, S.M., HARTSOOK, E., LUK, K.H., ALBERS, J.J., HAZZARD, W.R. (1984). *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 360-367.

- ARCE, V., AGUILERA, J. A., LINARES, A., GARCIA-PERER-GRIN, E. (1982). *Comp. Biochem. Physiol.* 71, 743-746.
- BACK, P., HAMPRECHT, B., LYNEN, F. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21.
- BALLARD, F. J., HANSON, R. W. (1967). *Biochem. J.* 102, 952-958.
- BARDENHEIER, J. W., POPJAK, G. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1023-1030.
- BASHOR, M. M. (1979). *Methods in Enzymology LVIII*, 119-131.
- BECKER, W. A., SPENCER, J. V., VERSTRATE, J. A., MIROSH, L. W. (1977). *Poultry Sci.* 56, 895-901.
- BEG, Z. H., BREWER, H. B. Jr. (1981). *Curr. Top. Cell. Regul.* 20, 139-184.
- BELL, J. J., SARGEANT, T. E., WATSON, J. A. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 1745-1758.
- BENSADOUN, A., ROTHFELD, A. (1972). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 814-817.
- BEVERIDGE, J. M. R., CONNELL, W. F., MEYERS, G. A., HAUST, H. L. (1960). *J. Nutr.* 71, 61-65.
- BHAT, S. C., RAMASARMA, T. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-788.
- BHAT, S. C., RAMASARMA, T. (1979). *Biochem. J.* 181, 143-151.

- BLOCH, K., BOREK, E., RITTENBERG, D. (1946). *J. Biol. Chem.* 162, 441-449.
- BOCHENEK, W., RODGERS, J.B. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 528, 1-16.
- BORTZ, W.M., STEELE, L. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 306, 85-94.
- BRADY, P.S., SCHUMANN, W.C., OHGAKU, S., SCOFIELD, R.F., LANDAN, B.R. (1982a). *J. Lipid Res.* 23, 1317-1320.
- BRADY, P.S., SCOFIELD, R.F., SCHUMANN, W.C., OHGAKU, S., KUMARAN, K., MARGOLIS, J.M., LANDAU, B.R. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 10742-10746.
- BRADY, P.S., SCOFIELD, R.F., MANN, S., LANDAU, B.R. (1983). *J. Lipid Res.* 24, 1168-1175.
- BRESLOW, J.L., LOTHROP, D.A., SPAULDING, D.R., KANDUTSCH, A.A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 398, 10-17.
- BROWN, M.S., DANA, S.E., GOLDSTEIN, J.L. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 789-796.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 7306-7314.
- BROWN, M.S., DANA, S.E., GOLDSTEIN, J.L. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 4025-4027.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1976). *Science* 191, 150-154.

- BROWN, M.S., FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L., KANEKO, I., ENDO, A. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 1121-1128.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3330-3337.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1980). *J. Lipid Res.* 21, 505-517.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1983). *J. Clin. Invest.* 72, 743-747.
- BRUNENGRABER, H., WEINSTOCK, S.B., STORY, D.L., KOPITO, R.R. (1981). *J. Lipid Res.* 22, 916-920.
- BULGER, R.E., TRUMP, B.F. (1968). *Am. J. Anat.* 123, 195-225.
- BURLEY, R.W., SLEIGH, R.W., SHENSTONE, F.S. (1984). *Eur. J. Biochem.* 142, 171-176.
- CARR, J.J., DRECKKER, I.J. (1962). *Laboratory manual of pediatric micro and ultramicrobiochemical techniques.* (O'Brien and Ibloft, eds.). F.A. Harper Row Publishers. New York.
- CARRELLA, M., DIETSCHY, J.M. (1977). *Am. J. Dig. Dis.* 22, 318-326.
- CARROLL, K.K. (1964). *Can. J. Biochem.* 42, 79-86.
- CARROLL, K.K., HAMILTON, R.M.G. (1973). *Lipids* 8, 635-640.

- CARROLL, K.K., HUFF, M.W. (1977). En "Atherosclerosis" (Manning and Haust, eds.), pp. 638-643. Plenum Press. New York.
- CARROLL, K.K., GIOVANNETTI, P.M., HUFF, M.W., MOASE, O., ROBERTS, D.C.K., WOLFE, B.M. (1978). Am. J. Clin. Nutr. 31, 1212-1221.
- CARSON, D.D., LENNARZ, W.J. (1981). J. Biol. Chem. 256, 4679-4686.
- CAVENEY, W.K., JOHNSTON, D., MELNYKOVYCH, G. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2103-2107.
- CAVENEY, W.K., CHEN, H.W., KANDUTSCH, A.A. (1981). J. Biol. Chem. 256, 2675-2681.
- CHANDLER, R.F., HOOPER, S.N., ISMAIL, H.A. (1979). Can. J. Pharm. Sci. 14, 15-17.
- CHANG, T.Y. (1983). The Enzymes 16, 491-521.
- CHANG, T.Y., DOOLITTLE, G.M. (1983). The Enzymes 16, 523-539.
- CHEN, H.W., CAVENEY, W.K., KANDUTSCH, A.A. (1979). J. Biol. Chem. 254, 716-720.
- CHENOUDA, M.S. (1984). Biochem. Med. 31, 87-96.
- CHENOWETH, W., ULLMANN, M., SIMPSON, R., LEVEILLE, G. (1981). J. Nutr. 111, 2069-2080.

- CHERNICK, S.S., MASORO, E.J., CHAIKOFF, I.L. (1950).  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 348-352.
- CHIN, D.J., LUSKEY, K.L., ANDERSON, R.G.W., FAUST,  
J.R., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1982). Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 79, 1185-1189.
- CHIN, J., CHANG, T.Y. (1982). Biochemistry 21, 3196-3202.
- CHOBANIAN, A.V., HOLLANDER, W. (1962). J. Clin. Invest.  
41, 1732-1737.
- CHRISTIAN, S.D., TUCKER, E.E. (1983). Am. Lab. 13, 106-  
109.
- CHVAPIL, M., STITH, P.L., TILLEMA, L.M., CARLSON, E.  
C., CAMPBELL, J.B., ESKELSON, C.D. (1976). Atheroscle-  
rosis 24, 393-405.
- CONNOR, W.E., HODGES, R.E., BREILER, R.E. (1961). J.  
Clin. Invest. 40, 894-901.
- CONNOR, W.E., STONE, D.B., HODGES, R.E. (1965). J. Clin.  
Invest. 43, 1691-1696.
- CONNOR, W.E. (1968). J. Am. Diet. Assoc. 52, 202.
- CONNOR, W.E., JOHNSTON, R., LIN, D.S. (1969). J. Lipid  
Res. 10, 388-394.
- COOK, W.H. (1968). En "Egg Quality" (Carter, T.C., ed.), pp.  
109-132. Oliver and Boyd, Edinburgh.



- COOKE, H.J., YOUNG, J.A. (1970). *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 318, 315-324.
- COOKE, H.J., YOUNG, J.A. (1973). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51, 199-207.
- COOPER, A.D., ERICKSON, S.K., NUTIK, R., SHREWSBURY, M.A. (1982). *J. Lipid Res.* 23, 42-52.
- CORNELL, R., GROVE, G.L., ROTHBLAT, G.H., HORWITZ, A.F. (1977). *Exp. Cell Res.* 109, 299-307.
- COROMINAS, A., PERMANYER, J.J. (1972). *Lípidos y lipoproteínas*, Vol. 1. Edit. Científico Médica. Barcelona.
- DANIELSSON, H. (1972). *Steroids* 20, 63-72.
- DARMADY, J.M., FOSBROOKE, A.S., LLOYD, J.K. (1972). *Br. Med. J.* 2, 685-688.
- DAVISON, A.N. (1965). *Adv. Lipid Res.* 3, 171-193.
- DAVISON, T.F. (1976). *Gen. Comp. Endocrin.* 29, 21-27.
- DEMBIC, Z., SABOLIC, I. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 714, 331-336.
- DEUEL, H.J. Jr. (1955). *The Lipids*, Vol. 2. Interscience Pubs. New York.
- DIETSCHY, J.M., SIPERSTEIN, M.D. (1967). *J. Lipid Res.* 8, 97-104.
- DIETSCHY, J.M., SPADY, D.K. (1984). *J. Lipid Res.* 25, 1469-1476.

- DREVON, C. A., HOVIG, T. (1977). *Acta Path. Microbiol. Scand.* 85, 1-18.
- DREVON, C. A. (1978). *Atherosclerosis* 30, 123-136.
- DUGAN, R. E., SLAKEY, L. L., BRIEDIS, A. B., PORTER, J. W. (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 21-27.
- DUGAN, R. E. (1981). En "Biosynthesis of Isoprenoids Compounds" (Porter, J. W. and Spurgeon, S. L., eds.), Vol. 1, pp. 95-159. Wiley, New York.
- DUNCAN, C. H., BEST, M. M. (1963). *Amer. J. Physiol.* 204, 505.
- EAGLE, H. (1959). *Science* 130, 432-437.
- EDGREN, B., HELLSTROM, K. (1972). *Nutr. Metabol.* 14, 331-338.
- EDMOND, J. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 72-80.
- EDMOND, J., POPJAK, G. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 66-71.
- EDMOND, J., FOGELMAN, A. M., POPJAK, G. (1976). *Science* 193, 154-156.
- EDWARDS, P. A., MUROYA, H., GOULD, R. G. (1972). *J. Lipid Res.* 13, 396-401.
- EDWARDS, P. A., GOULD, R. G. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 2891-2896.
- EDWARDS, P. A., POPJAK, G., FOGELMAN, A. M., EDMOND, J. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 1057-1063.

- EDWARDS, P.A., LEMONGELLO, D., KANE, J., SHECHTER, I., FOGELMAN, A.M. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 3715-3725.
- EISENBERG, S., LEVY, R.I. (1975). *Adv. Lipid Res.* 13, 1-89.
- EISENBERG, S. (1983). *Klin. Wochenschr.* 61, 119-132.
- ELWOOD, J.C., VAN BRUGGEN, J.T. (1961). *J. Lipid Res.* 2, 344-349.
- EPPENBERGER, H.M., FELLEBERG, R., RICHTERICH, R., AEBI, H. (1963). *Enzym. Biol. Clin.* 2, 139-174.
- ERDMAN, J.W. Jr., ELLIOT, J.G., LACHANCE, P.A. (1977). *Nutr. Rep. Intern.* 16, 37-46.
- ERICKSON, K.A., NES, W.R. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4873-4877.
- ERICKSON, S.K., DAVISON, A.M., GOULD, R.G. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 409, 59-67,
- ERICKSON, S.K., SHREWSBURY, M.A., BROOKS, C., MEYER, D.J. (1980). *J. Lipid Res.* 21, 930-941.
- EVANS, A.J. (1972). *Br. Poult. Sci.* 13, 595-602.
- FARRIS, R.P., HYG, M.S., FRANK, G.C., WEBBER, L.S., SRINIVASAN, S.R., BERENSON, G.S. (1982). *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 42-49.
- FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1979a). *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 86-89.

- FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1979b).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5018-5022.
- FEARS, R., MORGAN, B. (1976). Biochem. J. 158, 53-60.
- FEARS, R. (1978). Biochem. Soc. Trans. 6, 871-874.
- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., SEARLE, G., SIPERSTEIN,  
M.D. (1979). Clin. Res. 27, 484A.
- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., MacRAE, G., SIPERSTEIN,  
M.D. (1980a). Metabolism 29, 885-891.
- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., MacRAE, G., SIPERSTEIN,  
M.D. (1980b). J. Clin. Invest. 66, 646-654.
- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., SEARLE, G.L., MACHIDA,  
B.K., SIPERSTEIN, M.D. (1980c). J. Clin. Invest. 66, 361-  
366.
- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., MacRAE, G., KAYSEN, G.,  
SCHOENFELD, P.Y., SIPERSTEIN, M.D. (1983). Metab.  
Clin. Exp. 32, 215-223.
- FERDINAND, W. (1966). Biochem. J. 98, 278-283.
- FLETCHER, K., MYANT, N.B. (1958). J. Physiol. 144, 361-372.
- FLORSHEIM, W.H., FAIRCLOTH, M.A., GRAFF, D., AUSTIN,  
N.S., VELICOFF, S.M. (1963). Metabolism 12, 598-607.
- FLYNN, M.A., NOLPH, G.B., FLYNN, T.C., KAHRIS, R.,  
KRAUSE, G. (1979). Am. J. Clin. Nutr. 32, 1051-1057.

- FOGELMAN, A.M., EDMOND, J., POPJAK, G. (1975). J. Biol. Chem. 250, 1771-1775.
- FOMON, S.J. (1974). En "Infant Nutrition", 2nd ed., pp. 174-175. W.B. Sanders, Philadelphia.
- FRANTZ, I.D., SCHNEIDER, H.S., HINKELMAN, B.T. (1954). J. Biol. Chem. 206, 465-469.
- FRIEDMAN, G., GOLDBERG, S.J. (1973). J. Am. Med. Ass. 255, 610-612.
- FRIEDMAN, G., GOLDBERG, S.J. (1975). Am. J. Clin. Nutr. 28, 42-45.
- FRIEDMAN, M., BYERS, S.O. (1961). Am. J. Physiol. 201, 611-616.
- FRITZ, E. (1961). Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 153, 93-119.
- FUNG, C.H., KHACHADURIAN, A.K. (1980). J. Biol. Chem. 255, 676-680.
- GANS, J.H., BLOCK, A.J., CATER, M.R. (1973). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144, 609-612.
- GIBBONS, G.F. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 995-1003.
- GIBBONS, G.F., PULLINGER, C.R., CHEN, H.W., CAVENEE, W.K., KANDUTSCH, A.A. (1980). J. Biol. Chem. 255, 395-400.

- GIBSON, D.M., PARKER, R.A., STEWART, C.S., EVENSON, K.J. (1982). *Adv. Enzyme Regul.* 20, 263-283.
- GINSBURG, B.E., ZETTERSTROM, R. (1980). *Acta Paediatr. Scand.* 69, 581-585.
- GIRARD, H. (1965). *C. r. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Sér. D*, 260, 977-980.
- GLUECK, C.J., TSANG, R.C. (1972). *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 224-230.
- GLUECK, C.J., TSANG, R.C., BALISTRERI, W., FALLAT, R. (1972). *Metabolism* 21, 1181-1192.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
- GOLDSTEIN, J.L., HELGESON, J.A.S., BROWN, M.S. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 5403-5409.
- GOMEZ CAPILLA, J.A., MACARULLA, J.M., MARTIN-ANDRES, A., OSORIO, C. (1975). *Rev. Esp. Fisiol.* 31, 177-182.
- GONZALEZ-PACANOWSKA, D. (1983). *Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.*
- GONZALEZ-PACANOWSKA, D., MARCO, C., GARCIA-MARTINEZ, J., GARCIA-PEREGRIN, E. (1984). *Int. J. Biochem.* 16, 845-847.
- GOOD, L.J., GOODWIN, T.W. (1966). *Biochem. J.* 99, 735-746.

- GOODRIDGE, A.G., BALL, E.G. (1967). *Am. J. Physiol.* 213, 245-249.
- GOODRIDGE, A.G. (1968a). *Biochem. J.* 108, 655-661.
- GOODRIDGE, A.G. (1968b). *Biochem. J.* 108, 663-666.
- GOODRIDGE, A.G., GARAY, A., SILPANAUTA, P. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 1469-1475.
- GOODRIDGE, A.G., ADELMAN, T.G. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 3027-3032.
- GOODRIDGE, A.G., FISHER, P.W.F. (1978). *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37, 1308.
- GORDON, T., CASTELLI, W.P., HJORTLAND, M.C., KANNEL, W.B., DAWBER, T.R. (1977). *Am. J. Med.* 62, 707-714.
- GOULD, R.G., SWYRYD, E.A. (1966). *J. Lipid Res.* 7, 698-707.
- GREEN, M.H., CRIM, M., TRABER, M., OSTWALD, R. (1976). *J. Nutr.* 106, 516-528.
- GREEN, M.H., DOHNER, E.L., GREEN, J.B. (1981). *J. Nutr.* 111, 276-286.
- GREENGARD, O., THORNDIKE, J. (1974). *Enzyme* 17, 333-378.
- HABENICHT, A.J.R., GLOMSET, J.A., ROSS, R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 5134-5140.
- HAGENFELDT, L., HELLSTROM, K. (1972). *Life Sci.* 11, 669-676.

- HAHN, P., KIRBY, L. (1973). *J. Nutr.* 103, 690-696.
- HAHN, P., KOLDOVSKY, O. (1976). *Nutr. Rep. Int.* 13, 87-91.
- HALLORAN, L.G., SCHWARTZ, C.C., VLAHCEVIC, Z.R.,  
NISMAN, R.M. (1978). *Surgery* 84, 1-6.
- HAMILTON, R.M., CARROLL, K.K. (1977). *Lipids* 12, 145-148.
- HANKS, J.H., WALLACE, J.H. (1958). *Proc. Soc. Exp. Biol.*  
*Med.* 98, 188.
- HANSMA, H., OSTWALD, R. (1974). *Lipids* 9, 731-737.
- HANSON, R.W., BALLARD, F.J. (1967). *Biochem. J.* 105, 529-  
536.
- HARRIS, R.A., MacNINTCH, J.E., QUAOKENBUSH, F.W. (1966).  
*J. Nutr.* 90, 40-46.
- HARRY, D.S., DINNI, M., McINTYRE, N. (1973). *Biochim. Biophys.*  
*Acta* 296, 209-220.
- HASSAN, A.S., GALLON, L.S., ZIMMER, L.A., BALISTRERI,  
W.F., SUBBIAH, M.T.R. (1981). *Steroids* 38, 477-484.
- HAWKINS, R.A., WILLIAMSON, D.H., KREBS, H.A. (1971).  
*Biochem. J.* 122, 13-18.
- HEGSTED, D.M., McGANDY, R.B., MYERS, M.L., STARE, F.J.  
(1965). *Am. J. Clin. Nutr.* 17, 281-295.
- HEISS, G., JOHNSON, N.J., REILAND, S., DAVIS, C.E.,  
TYROLER, H.A. (1980). *Circulation* 62 (Suppl. IV), 116-136.



- HELLER, F.R. (1983). *Lipids* 18, 18-24.
- HELLSTROM, K.H., SIPERSTEIN, M.D., BRICKER, L.A.,  
LUBY, L.J. (1973). *J. Clin. Invest.* 52, 1303-1313.
- HERMUS, R.J.J. (1978). XIth International Congress of Nutrition.  
Rio de Janeiro (Brasil). Abstr. 124.
- HEVIA, P., VISEK, W.J. (1979). *J. Nutr.* 109, 32-38.
- HO, K.J., TAYLOR, C.B. (1968). *Arch. Pathol.* 122, 585-596.
- HO, K.J. (1975). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150, 271-277.
- HO, K.J. (1976). *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 187-191.
- HODGSON, P.A., ELLEFSON, R.D., ELVEBACK, L.R., HARRIS,  
L.E., NELSON, R.A., WEIDMAN, W.H. (1976). *Metabolism* 25,  
739-746.
- HUFF, M.W., HAMILTON, R.M.G., CARROLL, K.K. (1977).  
*Atherosclerosis* 28, 187-195.
- HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. (1981). *J. Biol.*  
*Chem.* 256, 5646-5655.
- HULBRON, G., AUBERT, R., BOUGEOIS, F., LEMONNIER, D.  
*J. Nutr.* 112, 1296-1305.
- IDE, T., TANAKA, T., SUGANO, M. (1979). *J. Nutr.* 109, 807-818.
- JABALQUINTO, A.M., CARDEMIL, E. (1980). *Lipids* 15, 196-199.
- JABALQUINTO, A.M., CARDEMIL, E. (1981a). *IRCS Med. Sci.*  
9, 457.

- JABALQUINTO, A.M., CARDEMIL, E. (1981b). Arch. Biochem. Biophys. 210, 132-139.
- JAMES, M.J., KANDUTSCH, A.A. (1979). J. Biol. Chem. 254, 8442-8446.
- JAMES, M.J., KANDUTSCH, A.A. (1980a). Biochim. Biophys. Acta 619, 432-435.
- JAMES, M.J., KANDUTSCH, A.A. (1980b). J. Biol. Chem. 255, 16-19.
- JAVITT, N.B., KOK, E., BURSTEIN, S., COHEN, B., KUTSCHER, J. (1981). J. Biol. Chem. 256, 12644-12646.
- JETT, C., MILLER, J.E. (1979). J. Lipid Res. 20, 1046.
- JOHNSON, B.L. Jr., EDMOND, J., FOGELMAN, A.M., POPJAK, G. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1264-1269.
- JOHNSON, R.C., SHAH, S.N. (1974). Lipids 9, 962-970.
- JOSHI, V.C., WAKIL, S.J. (1978). J. Biol. Chem. 253, 2120-2125.
- KAHN, S.G., WIND, S., SLOCUM, A., PFEFFER, D., YACOWITZ, H. (1963). J. Nutr. 80, 414-424.
- KANDUTSCH, A.A., SAUCIER, S.E. (1969). J. Biol. Chem. 244, 2299-2305.
- KANDUTSCH, A.A., CHEN, H.W. (1973). J. Biol. Chem. 248, 8408-8417.

- KANDUTSCH, A. A., CHEN, H. W. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 6057-6061.
- KANDUTSCH, A. A., CHEN, H. W. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 409-415.
- KANDUTSCH, A. A., CHEN, H. W., HEINIGER, H. J. (1978). *Science* 201, 498-501.
- KANDUTSCH, A. A., TAYLOR, F. R., SHOWN, E. P. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 12388-12397.
- KANEKO, I., HAZAMA-SHIMADA, Y., KURODA, M., ENDO, A. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 1207-1213.
- KANEKO, I., HAZAMA-SHIMADA, Y., ENDO, A. (1978). *Eur. J. Biochem.* 87, 313-321.
- KARG, H., SCHAMS, D. (1966). *Berl. Münch Tierarztl Wchesh.* 79, 434.
- KEELEY, F. W. (1979). *Can. J. Biochem.* 57, 1273-1280.
- KILSHEIMER, G. S., WEBER, D. R., ASHMORE, J. (1960). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 515-518.
- KIM, D. N., LEE, K. T., THOMAS, W. A. (1978). *Exp. Mol. Pathol.* 29, 385-399.
- KISIC, A., MONGER, D., PARISH, E. J., SATTERFIELD, S., RAULSTON, D. L., SCHROEPFER, G. J. Jr. *Artery* 3, 421-428.

- KISIC, A., TAYLOR, A.S., CHAMBERLAIN, J.S., PARISH, E.J., SCHROEPFER, G.J. Jr. (1978). Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.
- KITA, T., BROWN, M.S., BILHEIMER, D.M., GOLDSTEIN, J. L. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5693-5697.
- KOPITO, R.R., BRUNENGRABER, H. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5738-5740.
- KOPITO, R.R., WEINSTOCK, S.B., FREED, L.E., MURRAY, D.M., BRUNENGRABER, H. (1982). J. Lipid Res. 23, 577-583.
- KOPITO, R.R., MURRAY, D.M., STORY, D.L., BRUNENGRABER, H. (1984). J. Biol. Chem. 259, 372-377,
- KREBS, H.A. (1968). En "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber" (Staib, W. and Scholz, R., eds.), pp. 216-229. Springer-Verlag, New York.
- KRIS-ETHERTON, P.M., LAYMAN, D.K., YORK, P.V., FRANTZ, I.D. (1979). J. Nutr. 109, 1244-1257.
- KRITCHEVSKY, D. (1958). Cholesterol. (Wiley, J. and Sons, eds.). New York.
- KRITCHEVSKY, D. (1960). Metabolism 9, 984-994.
- KRITCHEVSKY, D. (1974). Adv. Drug Res. 9, 41.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S.A., STORY, J.A. (1978). Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 37, 747,

- KRUSKI, A.W., NARAYAN, K.A. (1972). *Lipids* 7, 742-749.
- KWITEROVICH, P.O. (1977). En "Hyperlipidemia, diagnosis and therapy" (Rifkind and Levy, eds.), p. 260. Grune & Stratton, New York.
- LACOMBE, C., CORRAZE, G., NIBBELINK, M. (1983). *Lipids* 18, 306-312.
- LANGSLOW, D.R., BUTLER, E.J., HALES, C.N., PEARSON, A.W. (1970). *J. Endocrinol.* 46, 243-260.
- LANGSLOW, D.R., HALES, C.N. (1971). En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl" (Bell, D.J. and Freeman, B.M., eds.) Vol. 1, pp. 521-547. Academic Press. London.
- LAPORTE, D.C., WALSH, D.E., KOSHLAND, D.E. Jr. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 14068-14075.
- LEFEVRE, A.F., DECARLI, L.M., LIEBER, C.S. (1972). *J. Lipid Res.* 13, 48-55.
- LEVEILLE, G.A., FEIGENHAUM, A.S., FISHER, H. (1960). *Arch. Biochem. Biophys.* 86, 67-70.
- LI, J.R., BALE, L.K., SUBBIAH, M.T.R. (1979). *Atherosclerosis* 32, 93-98.
- LI, J.R., BALE, L.K., KOTTKE, B.A. (1980). *J. Clin. Invest.* 65, 1060-1068.
- LICHTENSTEIN, A.H., BRECHER, P. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 9098-9104.

- LIEBERMAN, I., GINGOLD, J.L. (1962). *Methods in Enzymology* V, 119-122.
- LINDER, J.R., BEITZ, D.C. (1978). *J. Lipid Res.* 19, 836-840.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacLEOD, M.G., JEWITT, T.R. (1984). *Comp. Biochem. Physiol.* 78, 687-690.
- MAHLEY, R.W., WEISGRABER, K.H., INNERARITY, T. (1976). *Biochemistry* 15, 2979-2985.
- MAHLEY, R.W. (1982). *Med. Clin. North Am.* 66, 375-402.
- MARCO, C., GONZALEZ-PACANOWSKA, D., LINARES, A., GARCIA-PEREGRIN, E. (1983). *Neurochem. Res.* 8, 711-721.
- MARMOT, M.G., PAGE, C.M., ATKINS, E., DOUGLAS, J.W.B. (1980). *J. Epidemiol. Comm. Health* 34, 164-167.
- MARTENSON, E.H. (1963). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 164-180.
- MATHE, D., CHEVALLIER, F. (1979). *J. Nutr.* 109, 2076-2084.
- MATHE, D., CHEVALLIER, F. (1980). *Digestion* 20, 121-136.
- MATTSON, F.M., ERICKSON, B.A., KLIGMAN, A.M. (1972). *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 589-594.
- MAYER, D. (1976). *Arch. Toxicol.* 36, 267-276.

- Mc GILL, H.C. Jr., MOTT, G.E., BRAMBLETT, C.A. (1976).  
Primates Med. 9, 41-65.
- McGILL, H.C., Jr., McMAHAN, C.A., KRUSKI, A.W., KELLEY,  
J.L., MOTT, G.E. (1981). Arteriosclerosis 1, 337-344.
- McINTOSH, G.H., BULMAN, F.H., ILLMAN, R.J., TOPPING, D.  
L. (1984). Nutr. Rep. Int. 29, 673-681.
- McNAMARA, D.J., QUACKENBUSH, F.W., RODWELL, V.W.  
(1972). J. Biol Chem. 247, 5805-5810.
- MILLER, G.J., MILLER, N.E. (1975). Lancet 1, 16-19.
- MILLS, J.T., ADAMANY, A.M. (1978). J. Biol. Chem. 253, 5270-  
5273.
- MOL, M.A.E., DE SMET, R.C., TERPSTRA, A.H.M., WEST,  
C.E. (1982). J. Nutr. 112, 1029-1037.
- MOORE, J.H., DORAN, B.M. (1962). Biochem. J. 84, 506-513.
- MORRIS, R.S., ROSS, W.C. (1973). Nutr. Rep. Int. 8, 131-143.
- MOTT, G.E., McMAHAN, C.A., KELLEY, J.L., FARLEY, C.  
M., McGILL, H.C. Jr. (1982). Atherosclerosis 45, 191-202.
- NAMBUDIRI, A.M.D., RANGANATHAN, S., RUDNEY, H. (1980).  
J. Biol. Chem. 255, 5894-5899.
- NARAYAN, K.A. (1971). Atherosclerosis 13, 205-215.
- NARAYAN, K.A., CALHOUN, W.K. (1976). Adv. Exp. Med.  
Biol. 67, 383-401.

- NASEEM, S.M., KHAN, M.A., HEALD, F.P., NAIR, P.P.  
(1980). *Atherosclerosis* 36, 1-8.
- NERVI, F.O., DIETSCHY, J.M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250,  
8704-8711.
- NERVI, F.O., WEIS, H.J., DIETSCHY, J.M. (1975). *J. Biol.*  
*Chem.* 250, 4145-4151.
- NERVI, F.O., DIETSCHY, J.M. (1978). *J. Clin. Invest.* 61,  
895-909.
- NESS, G.C., DUGAN, R.E., LAKSHMANAN, M.R.,  
NEPOKROEFF, C.M., PORTER, J.W. (1973). *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA* 70, 3839-3842.
- NOBLE, R.C., MOORE, J.H. (1964). *Can. J. Biochem.* 42,  
1729-1741.
- NOYAN, A., LOSSOW, W.J., BROTH, N., CHAIKOFF, I.L.  
(1964). *J. Lipid Res.* 5, 538-541.
- O'BRIEN, B.C., SKUTCHES, C.L., HENDERSON, G.R.,  
REISER, R. (1977). *J. Nutr.* 107, 1131-1138.
- O'HEA, E.K., LEVEILLE, G.A. (1968). *Comp. Biochem.*  
*Physiol.* 26, 111-120.
- O'HEA, E.K., LEVEILLE, G.A. (1969). *J. Nutr.* 99, 338-344.
- OSTWALD, R., SHANNON, A. (1964). *Biochem J.* 91, 146-154.
- PAIK, Y.K., TRZASKOS, J.M., SHAFIEE, A., GAYLOR, J.  
L. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 13413-13423.



- PANINI, S.R., SEXTON, R.C., RUDNEY, H. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 7767-7771.
- PEARCE, J. (1977). *Int. J. Biochem.* 8, 269-275.
- PEARCE, J. (1980). *Biochem. Soc. Trans.* 8, 295-296.
- PERSSON, B., GENTZ, J. (1966). *Acta Paediatr. Scand.* 53, 353-362.
- PETERSON, D.W., NICHOLS, C.W. Jr., SHNEOR, E.A. (1952). *J. Nutr.* 47, 57-65.
- POPJAK, G. (1970). *Ann. Int. Med.* 72, 106-108.
- POPJAK, G. (1971). *Harvey Lect. Series* 65, 127-156.
- POPJAK, G., BOEHM, G., PARKER, T.S., EDMOND, J., EDWARDS, P.A., FOGELMAN, A.M. (1979). *J. Lipid Res.* 20, 716-728.
- PORTER, M.W., YAMANAKA, W., CARLSON, S.D., FLYNN, M.A. (1977). *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 490-495.
- PURTON, M.D. (1970). *J. Anat.* 106, 189.
- QUESNEY-HUNEEUS, V., WILEY, M.H., SIPERSTEIN, M.D., (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5842-5846.
- QURESHI, A.A., ABUIRMEILEH, N., DIN, Z.Z., AHMAD, Y., BURGER, W.C., ELSON, C.E. (1983). *Atherosclerosis* 48, 81-94.

- RAAIJ, J.M.A. van, KATAN, M.B., HAUTVAST, J.G.A.J.  
(1979). *Lancet* 11, 958.
- RAAIJ, J.M.A. van, KATAN, M.B., HAUTVAST, J.G.A.J.,  
HEHMUS, R.J.J. (1981). *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1261-1271.
- RAMACHANDRAN, C.K., SHAH, S.N. (1976). *Biochem. Biophys.  
Res. Commun.* 69, 42-47.
- RAMIREZ, H., ALEJANDRE, M.J., ZAFRA, M.F., SEGOVIA,  
J.L., GARCIA-PEREGRIN, E. (1984). *Int. J. Biochem.* 16,  
291-295.
- RANGANATHAN, S., NAMBU DIRI, A.M.D., RUDNEY, H.  
(1981). *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 592-597.
- RANGANATHAN, S., RAMASARMA, T. (1975). *Biochem. J.*  
148, 35-39.
- RAO, K.S., OLSEN, R.E. (1967). *Biochem. Biophys. Res.  
Commun.* 26, 668-673.
- RASKIN, P., SIPERSTEIN, M.D. (1974). *J. Lipid Res.* 15,  
20-25.
- RAULSTON, D.L., MISHAW, C.O., PARISH, E.J.,  
SCHROEPFER, G.J. Jr. (1976). *Biochem. Biophys. Res.  
Commun.* 71, 984-989.
- REISER, R., SIDELMAN, Z. (1972). *J. Nutr.* 102, 1009-1016.
- RIGHETTI, M., WILEY, M.H., MURRILL, P.A., SIPERSTEIN,  
M.D. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 2716-2721.

- ROBERTS, D.C.K., HUFF, M.W., CARROLL, K.K. (1979).  
Nutr. Metab. 23, 476-486.
- RODBARD, S., KATZ, L.N., BOLENE, C., PICK, R.,  
LOWENTHAL, M., GROS, G. (1951). Circulation 3, 867-874.
- RODWELL, V.W., McNAMARA, D.J., SHAPIRO, D.J. (1973).  
Adv. Enzymol. 38, 373-412.
- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L., MITSCHELEN, J.J.,  
(1976). Adv. Lipid Res. 14, 1-74.
- ROMSOS, D.R., LEVEILLE, G.A. (1974). Adv. Lipid Res.  
12, 97-146.
- ROSENMAN, R.H., SHIBATA, E. (1952). Proc. Soc. Exp. Biol.  
Med. 81, 296-298.
- ROUX, J.F. (1966). Metabolism 15, 856-864.
- RUCKER, R.B., GOETLICH-RIEMANN, W., TOM, K., CHEN,  
M., POASTER, J., KOERNER, S. (1975). J. Nutr. 105, 46-  
56.
- RUDEL, L.L., SHAH, R., GREENE, D.G. (1979). J. Lipid  
Res. 20, 55-65.
- RYDER, E., CAMPOS, G. (1979a). Invest. Clin. 20, 178-187.
- RYDER, E., CAMPOS, G. (1979b). Proc. Int. Cong. Biochem.  
11th, Toronto, p. 395.

- SABINE, J.R., ABRAHAM, S., CHAIKOFF, I.L. (1967).  
Cancer Res. 27, 793-799.
- SABLE-AMPLIS, R., SICART, R. (1982). Biochem. Biophys.  
Res. Commun. 108, 1092-1100.
- SANTIAGO, E., GANSER, A., MACARULLA, J.M., GUERRA,  
F. (1968). Rev. Esp. Fisiol. 24, 37-41.
- SATO, Y., SONODA, Y., MORISAKI, M., IKEKAWA, N.  
(1984). Chem. Pharm. Bull. 32, 3305-3308.
- SCHJEIDE, O.A., WILKENS, M., McCANDLESS, R.G.,  
MUNN, R., PETERSON, M., CARLSEN, E. (1963). Am.  
Zool. 3, 167-184.
- SCHJEIDE, O.A., WILKENS, M. (1964). Nature 201, 42-44.
- SCHMIDT, R.A., GLOMSET, J.A., WIGHT, T.N., HABENICHT,  
A.J.R., ROSS, R. (1982). J. Cell Biol. 95, 144-153.
- SCHONFELD, G., PATSCH, W., RUDEL, L.L., NELSON, C.,  
EPSTEIN, M., OLSON, R.E. (1982). J. Clin. Invest. 69,  
1072-1080.
- SCHROEPFER, G.J. Jr., MONGER, D., TAYLOR, A.S.,  
CHAMBERLAIN, J.S., PARISH, E.J., KISIC, A., KAN-  
DUTSCH, A.A. (1977a). Biochem. Biophys. Res. Commun.  
78, 1227-1233.
- SCHROEPFER, G.J. Jr., PARISH, E.J., CHEN, H.W., KAN-  
DUTSCH, A.A. (1977b). J. Biol. Chem. 252, 8975-8980.

- SCHROEPFER, G.J. Jr., PASCAL, R.A. Jr., SHAW, R.,  
KANDUTSCH, A.A. (1978). *Biochem. Biophys. Res.*  
*Commun.* 83, 1024-1031.
- SCHROEPFER, G.J. Jr., PARISH, E.J., PASCAL, R.A. Jr.,  
KANDUTSCH, A.A. (1980a). *J. Lipid Res.* 21, 571-584.
- SCHROEPFER, G.J. Jr., WALKER, V., PARISH, E.J., KI-  
SIC, A. (1980b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 813-  
818.
- SCHROEPFER, G.J. Jr. (1981). *Ann. Rev. Biochem.* 50, 585-  
621.
- SCHWARTZ, C.C., HALLORAN, L.G., VLAHCEVIC, Z.R.,  
GREGORY, D.H., SWELL, L. (1978). *Science* 200, 62-64.
- SEGLEN, P.O. (1973). *Exp. Cell. Res.* 82, 391-398.
- SENIOR, J.R. (1964). *J. Lipid Res.* 5, 495-521.
- SEXTON, R.C., PANINI, S.R., AZRAN, F., RUDNEY, H.  
(1983). *Biochemistry* 22, 5687-5692.
- SHAH, R.V., PATEL, S.T., PILO, B. (1978). *Can. J. Zool.*  
56, 2083-2087.
- SHAH, S.N. (1973). *Lipids* 8, 284-288.
- SHAPIRA, N., NIR, I., BUDOWSKI, P. (1978). *Br. J. Nutr.*  
39, 289-295.

- SHAPIRO, D.J., RODWELL, V.W. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 867-872.
- SHAPIRO, D.J., NORDSTROM, J.L., MITSCHELEN, J.J., RODWELL, V.W., SCHINKE, R.J. (1974). *Biochem. Biophys. Acta* 370, 369-377.
- SHEFER, S., HAUSER, S., LAPAR, V., MOSBACH, E.H. (1973). *J. Lipid Res.* 14, 573-580.
- SHRAGO, E., GLENNON, J.A., GORDON, E.S. (1971). *Metabolism* 20, 54-62.
- SILLER, W.G. (1971). En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl" (Bell, D.J. and Freeman, B.M., eds.), pp. 197-231. Academic Press. London and New York.
- SINENSKY, M., DUWE, G., PINKERTON, F. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 4482-4486.
- SIPERSTEIN, M.D., FAGAN, V.M. (1964). *Cancer Res.* 24, 1108-1115.
- SIPERSTEIN, M.D., FAGAN, V.M. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 602-609.
- SIPERSTEIN, M.D., FAGAN, V.M., MORRIS, H.P. (1966). *Cancer Res.* 26, 7-11.
- SIPERSTEIN, M.D. (1984). *J. Lipid Res.* 25, 1462-1468.

- SIRTORI, C.R., AGRADI, E., CONTI, F., MANTERO, O.,  
GATTI, E. (1977). *Lancet* 1, 275-277.
- SKLAN, D., BUDOWSKI, P. (1979). *Lipids* 14, 386-390.
- SLAKEY, L.L., CRAIG, M.C., BEYTIA, E., BRIEDIS, A.,  
FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESHI, A.F.,  
SUBBARAYAN, C., PORTER, J.W. (1972). *J. Biol. Chem.*  
247, 3014-3022.
- SLATER, G., MEAD, J., DHOPEHWARKAR, G., ROBINSON,  
S., ALFIN-SLATER, R.B. (1976). *Nutr. Rep. Int.* 14, 249-  
259.
- SNEDECOR, G.W. (1956). *Statistical Methods*. 5th ed. Iowa  
State College Press. Ames.
- SONODA, Y., SATO, Y. (1983). *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1698-  
1701.
- SPANNER, R. (1924/25). *Morph. Jb.* 54, 560-632.
- SRERE, P.A., CHAIKOFF, I.L., TREITMAN, S.S., BURSTEIN,  
L.S. (1950). *J. Biol. Chem.* 182, 629-634.
- SRINIVASAN, S.R., RADHAKRISHNAMURTHY, B., CALFERES,  
E.R. Jr., BERENSON, G.S. (1979). *Lipids* 14, 559-565.
- STANGE, E.F., DIETSCHY, J.M. (1984). *J. Lipid Res.* 25, 703-  
713.
- STORY, J.A., KRITCHEVSKY, D. (1974). *Experientia* 30, 242-  
243.

- STUDENT (GOSSET, W.S.) (1907). *Biometrika* 5, 351-360.
- STURKIE, P.D. (1965). *Avian Physiology*, 2nd ed. Cornell University Press. Ithaca, New York.
- TAKEUCHI, N., ITO, M., YAMAMURA, Y. (1976). *Adv. Exp. Med. Biol.* 67, 267-288.
- TAKEUCHI, N., YAMAMURA, Y., KATAYAMA, Y., HAYASHI, C., UCHIDA, K. (1976). *Exp. Geront.* 11, 121-126.
- TANAKA, R.D., EDWARDS, P.A., LAN, S.F., FOGELMAN, A.M. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 13331-13339.
- TAVARES, I.A., COOLBEAR, T., HEMMING, F.W. (1981). *Arch. Biochem. Biophys.* 207, 427-436.
- TAVORMINA, P.A., GIBBS, M.H., HUFF, J.W. (1956). *J. Am. Chem. Soc.* 4498-4499.
- TEEKELL, R.A., BREIDENSTEIN, C.P., WATTS, A.B. (1975). *Poultry Sci.* 54, 1036-1042.
- TENNANT, J.R. (1964). *Transplantation* 2, 685.
- TERPSTRA, A.H.M., BEYNEN, A.C. (1984). *Comp. Biochem. Physiol.* 77, 523-528.
- TOMERA, J.F., KOPITO, R.R., BRUNENGRABER, H. (1983). *Biochem. J.* 210, 265-268.
- TRENTALANCE, A., LEONI, S., MANGIANTINI, M.T., SPAGNUOLO, S., FEINGOLD, K., HUGHES-FULFORD, M., SIPERSTEIN, M.D., COOPER, A.D., ERICKSON, S.K. (1984). *Biochem. Biophys. Acta* 794, 142-151.



- TROUT, E.C. Jr., KAO, K.T., HIZER, C.A., McGAVACK, T.H. (1962). *J. Geront.* 17, 363-368.
- TRZASKOS, J.M., BOWEN, W.D., SHAFIEE, A., FISCHER, R.T., GAYLOR, J.L. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 13402-13412.
- TSUJI, F.I., BRIN, M., WILLIAMS, H.H. (1955). *Arch. Biochem. Biophys.* 56, 290-296.
- TURLEY, S.D., DIETSCHY, J.M. (1979). *J. Lipid Res.* 20, 923-934.
- UCHIDA, K., NOMURA, Y., KADOWAKI, M., TAKASE, H., TAKANO, K., TAKEUCHI, N. (1978). *J. Lipid Res.* 19, 544-552.
- VAN MIEROP, L.H.S., BERTUCH, C.J. (1967). *Am. J. Physiol.* 212, 43-48.
- VLAHCEVIC, Z.R., SCHWARTZ, C.C., GUSTAFSSON, J., HALLORAN, L.G., DANIELSSON, H., SWELL, L. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 2925-2933.
- VOLPE, J.J., OBERT, K.A. (1982). *J. Neurochem.* 38, 931-938.
- VUYLSTEKE, C.A., DE DUVE, C. (1953). *Arch. Int. Physiol.* 61, 273-274.
- WARNICK, G.R., ALBERS, J.J. (1978). *J. Lipid Res.* 19, 65-76.

- WEINSTOCK, S.B., KOPITO, R.R., ENDEMANN, G., TOMERA, J.F., MARINIER, E., MURRAY, D.M., BRUNENGRABER, H. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 8939-8944.
- WEIS, H.J., DIETSCHY, J.M. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, 398, 315-324.
- WHATLEY, B.J., GREEN, J.B., GREEN, M.H. (1981). *J. Nutr.* 111, 432-441.
- WILEY, M.H., HOWTON, M.M., SIPERSTEIN, M.D. (1977a). *J. Biol. Chem.* 252, 548-554.
- WILEY, M.H., MURRILL, P.A., HOWTON, M.M., HULING, S. L., COHEN, D.C., SIPERSTEIN, M.D. (1977b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1023-1030.
- WILEY, M.H., HOWTON, M.M. (1978). *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37, 1479.
- WILEY, M.H., HOWTON, M.H., SIPERSTEIN, M.D. (1978). *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37, 1152.
- WILEY, M.H., HOWTON, M.M., SIPERSTEIN, M.D. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 837-842.
- WILEY, M.H., FEINGOLD, K.R., HOWTON, M.M., SIPERSTEIN, M.D. (1982). *Diabetologia* 22, 118-121.
- WILLIAMS, P., ROBINSON, D., BAILEY, A. (1979). *Lancet* 1, 72-75.
- WILSON, J.D. (1962). *Am J. Physiol.* 203, 1029-1032.

- WISS, O., WISS, V. (1977a). *Helv. Chim. Acta* 60, 2566-2575.
- WISS, O., WISS, V. (1977b). *Helv. Chim. Acta* 60, 2686-2694.
- WONG, H.Y.C. (1975). *Adv. Exp. Med. Biol.* 63, 381-391.
- WROBEL, J. (1972). *Acta Biochim. Pol.* 19, 297-305.
- YADAV, N.R., LIENER, I.E. (1977). *Nutr. Rep. Int.* 16, 385-389.
- YAMAMOTO, M., YAMAMURA, Y. (1971). *Atherosclerosis* 13, 365-374.
- ZIEGLER, E.E., FOMON, S.J. (1980). En "Childhood Prevention of Atherosclerosis and Hypertension" (Lauer, R.M. and Shekelle, R.B., eds.), pp. 121-125. Raven Press, New York.



Biblioteca Universitaria de Granada



01066194