

MODULACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y DE LA
COMPOSICION LIPIDICA DE LOS MICROSOMAS EN FUNCION DE LA
EDAD Y DE LA SUPLEMENTACION ORAL DE COLESTEROL

María José Alejandre Pérez

TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA **285**

C 3 / 28

R. 48.743
B-137-82

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

MODULACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA
Y DE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LOS MICROSOMAS EN FUNCION DE LA
EDAD Y DE LA SUPLEMENTACION ORAL DE COLESTEROL

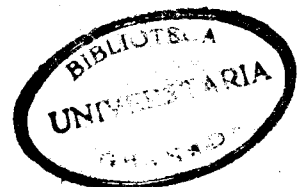
M^a JOSE ALEJANDRE PEREZ

Tesis doctoral

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º DOCUMENTO 613442065
N.º LIBRO 115399461

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980



Im.Un.Gr.58.1980. Depósito legal Gr.311.1980.
Imprenta de la Universidad de Granada. Hospital Real.

Tesis doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Eduardo García Peregrín, prof. agregado del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada y codirigida por la Prof. Dra. Dña. Segovia Parra. Fue leída el día 11 de julio de 1980, ante el tribunal formado por los Profesores: Guirao Pérez, Granada; Lozano Teruel, Murcia; Macarulla Greoles, Bilbao; García Peregrín, Granada; Suárez Ortega, Granada. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude"

Mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Fermin Sanchez de Medina, Director del Departamento de Bioquímica, por su cordial acogida y su gran humanidad.

Al Prof. Dr. D. Eduardo Garcia Peregrin, Director de esta Tesis, mi más profundo agradecimiento por su confianza y constante orientación a lo largo de este trabajo.

A la Prof^a. Dra. Josefa Liboria Segovia Parra, Co-Directora de este trabajo, por haberme iniciado en la investigación, por la constante ilusión, ánimo y valiosa ayuda que siempre he recibido de ella.

A la Prof^a. Dra. Maria Dolores Suárez Ortega, de igual modo, por la gran ayuda y dedicación prestada en la realización de esta memoria.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que de un modo u otro me han ayudado, en especial a: M^a Flor, Ana, Juan Antonio y Loli, por su inestimable colaboración en la realización experimental de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial quisiera expresar a mi buen amigo y compañero Hilario, con quien he compartido la realización de este trabajo, por la constante amabilidad, buen humor y paciencia que le caracterizan.

No quisiera olvidar al resto de los componentes del Departamento por la amistad y ayuda que me han brindado, en especial a Maria por su desinteresada y valiosa labor.

Al Prof. Dr. D. Cecilio Gonzalez, Jefe de la Sección de Radioquímica de la Facultad de Ciencias por su constante colaboración en este campo y a la Dra. M^a Angeles Ferro por las determinaciones de radiactividad.

A Avigrana S. A. por la cesión gratuita de los animales requeridos en este trabajo.

A todos, gracias.

A Javier

A mis padres

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA : colesterol acil transferasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
c. p. m.	Cuentas por minuto
d. p. m.	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-diaminotetraacetico
E. S. R.	Relación de canales externos
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG	Acido 3-hidroxi-3-metil-glutárico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MVA	Acido mevalónico
NADP	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido reducido
POPOP	2, 2'-p-fenilen bis-(5-feniloxazol)
PPO	2-5-difeniloxazol
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
P-MVA	Acido fosfomevalónico
PP-MVA	Acido pirofosfomevalónico
-SH	Radical sulfhidrilo
SM	Esfingomielina

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	19
I.- PARTE TEORICA.....	27
1. A.- "Turnover" del colesterol.....	29
1. A. 1.- Absorción.....	30
1. A. 2.- Eliminación.....	31
1. A. 3.- Transformación a ácidos biliares.....	32
1. A. 4.- Transporte.....	33
1. B.- Síntesis de colesterol. Localización tisular.....	36
1. C.- Aspectos particulares del metabolismo del colesterol en aves.....	41
1. D.- Importancia de la HMG-CoA reductasa en la biosíntesis del colesterol.....	46
1. D. 1.- La HMG-CoA reductasa como factor limitante	48
1. D. 2.- La HMG-CoA reductasa como lugar de regulación.....	49
1. D. 3.- Regulación en otros puntos de la ruta biosintética.....	50
1. D. 4.- Distribución de la HMG-CoA reductasa.....	51
1. D. 5.- Ensayo de la actividad HMG-CoA reductasa...	52
1. D. 6.- Ritmo diurno de la HMG-CoA reductasa.....	54
1. D. 7.- Cambios de la HMG-CoA reductasa durante el desarrollo.....	54
1. E.- Regulación de la HMG-CoA reductasa.....	57
1. E. 1.- Modulación covalente.....	57
1. E. 2. Efecto del colesterol de la dieta.....	61
1. E. 2. 1.- Efecto directo sobre la enzima..	61
1. E. 2.2.- Efecto sobre la membrana microsomal.....	63

	<u>Página</u>
1. E. 3. - Otros factores que influyen sobre la HMG-CoA reductasa.....	67
II. - PLAN DE TRABAJO.....	73
III. - PARTE EXPERIMENTAL.....	77
3. A. - MATERIAL.....	79
3. A. 1. - Material biológico.....	79
3. A. 2. - Acondicionamiento de los animales.....	79
3. A. 3. - Productos.....	80
3. A. 4. - Aparatos.....	80
3. B. - METODOS.....	83
3. B. 1. - Aislamiento de microsomas.....	83
3. B. 2. - Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa.....	84
3. B. 2. 1. - Fundamento.....	85
3. B. 2. 2. - Soluciones utilizadas.....	86
3. B. 2. 3. - Reacción enzimática.....	86
3. B. 2. 4. - Aislamiento y medida del producto de reacción.....	87
3. B. 2. 5. - Cálculos.....	89
3. B. 3. - Incorporación de acetato a lípidos insaponificables.....	89
3. B. 3. 1. - Fundamento.....	89
3. B. 3. 2. - Preparación de las soluciones utilizadas.....	90
3. B. 3. 3. - Obtención e incubación de los cortes.....	91
3. B. 3. 4. - Obtención de los lípidos insaponificables.....	92
3. B. 3. 5. - Cálculos.....	93

	<u>Páginas</u>
4.A.2.2.- Influencia del CINA	124
4.A.2.3.- Influencia del EDTA.....	124
4.A.2.4.- Influencia de los componentes del tampon en la determinación de proteínas.....	124
4.A.3.- Influencia del tiempo de incubación.....	128
4.A.4.- Influencia de cantidad de proteínas.....	128
4.A.5.- Estabilidad de la actividad reductasa	135
4.A.5.1.- Conservación de los microsomas ..	135
4.A.5.2.- Efecto del ión F ⁻	135
4.B.- Evolución de la actividad HMG-CoA reductasa a lo lar <u>go</u> del desarrollo postnatal.....	142
4.B.1.- Condiciones de crecimiento estandar.....	142
4.B.1.1.- Actividad en hígado.....	142
4.B.1.2.- Actividad en cerebro.....	144
4.B.1.3.- Actividad en asa duodenal.....	144
4.B.2.- Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta.....	144
4.B.2.1.- Actividad en hígado.....	149
4.B.2.2.- Actividad en cerebro.....	149
4.B.2.3.- Actividad en asa duodenal.....	149
4.C. Incorporación de ¹⁴ C -Acetato a lípidos insaponificables.	156
4.C.1.- Establecimiento de las condiciones óptimas....	156
4.C.1.1.- Influencia del peso de tejido utilizado	156
4.C.1.2.- Influencia del tiempo de incubación.	160
4.C.2.- Variaciones a lo largo del desarrollo postnatal. Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta.....	160

	<u>Páginas</u>
4.C.2.1.- Hígado.....	160
4.C.2.2.- Asa duodenal.....	163
4.D.- Variaciones en la cantidad de colesterol y fosfolípidos de los microsomas en función de la edad.....	167
4.D.1.- Microsomas de hígado.....	167
4. D. 1.1.- Colesterol total, libre y esterificado.....	167
4. D. 1.2.- Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol.....	168
4. D. 1.3.- Relación molar colesterol / fósforo lipídico.....	174
4. D. 2.- Microsomas de cerebro.....	181
4. D. 2.1.- Colesterol total, libre y esterificado	181
4. D. 2.2.- Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol.....	185
4.D.2.3.- Relación molar colesterol / fósforo lipídico.....	190
4. D. 3.- Microsomas de asa duodenal.....	190
4.D.3.1.- Colesterol total, libre y esterificado.	190
4.D.3.2.- Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol.....	195
4. D. 3.3.- Relación molar colesterol / fósforo lipídico.....	203

	<u>Páginas</u>
V. - DISCUSION.....	209
VI. - CONCLUSIONES.....	235
VII. - BIBLIOGRAFIA.....	243

INTRODUCCION

La ruta metabólica que conduce a la síntesis del colesterol a partir de acetil-CoA constituye una de las secuencias más complejas y a la vez más intensamente estudiadas durante los últimos años. La importancia del colesterol como constituyente estructural de las membranas celulares y como precursor de otros compuestos dotados de diferentes funciones biológicas ha hecho de este tema uno de los más estudiados en su regulación a nivel enzimático. Dos grandes etapas suelen distinguirse en el proceso de biosíntesis del colesterol. La primera comprende la transformación del acetil-CoA en ácido mevalónico, mientras que la segunda consiste en la transformación del ácido mevalónico en colesterol, vía isopentenil pirofosfato y escualeno. Es a nivel de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, enzima que cataliza el último paso de la primera etapa, sobre la que se centra finalmente la regulación de todo el proceso biosintético, si bien en los últimos años parece haberse localizado un segundo punto de control importante entre el ácido mevalónico y el isopentenilpirofosfato.

Todos los trabajos realizados en mamíferos tienden, en efecto, a considerar a la HMG-CoA reductasa como la enzima más regulada de toda la secuencia y la limitante en último extremo de la síntesis del colesterol. Su modulación por el propio colesterol y por diversos factores fisiológicos así como por agentes químicos de acción hipolesterolémica ha sido estudiada con cierto detalle en mamíferos. Asimismo, se acepta en la actualidad que la enzima está regulada covalentemente por un proceso de fosforilación-defosforilación catalizado a su vez enzimáticamente, el cual permite la interconversión reversible de las formas activa (defosforilada) e inactiva (fosforilada) de la reductasa, contribuyendo de esta forma a la regulación de su actividad sin que se vea afectada su velocidad de síntesis.

Lo anteriormente expuesto ha sido constatado en mamíferos en estado adulto, siendo muy poco lo que se conoce a este respecto en otras especies animales y en condiciones de desarrollo diferentes. La mayoría de los animales y el propio hombre son capaces de sintetizar gran parte del colesterol que necesitan. El hígado y el intestino parecen ser los lugares primarios en que tiene lugar la síntesis del colesterol en el adulto. Sin embargo, es en los comienzos de la vida de un hombre, cuando el colesterol parece desarrollar uno de sus principales papeles. En efecto, el colesterol es el componente lipídico mayoritario de la mielina habiéndose considerado que, en conjunto, constituye alrededor del 20 % de todos los lípidos del cerebro. De aquí que su importancia en el proceso de mielinización esté universalmente reconocida. Dada la complejidad de la mielina, es lógico que los mecanismos que a ella conducen sean igualmente complejos y requieran la actuación conjunta de múltiples resortes biosintéticos.

Aunque en términos generales se han observado características comunes en el metabolismo de mamíferos y aves, el desarrollo de la mielina presenta algunas particularidades diferenciales en estos animales. Así, las aves comienzan su mielinización durante el desarrollo embrionario y lo continúan en el periodo inmediatamente posterior a la eclosión, mientras que las especies de mamíferos nacen muy poco mielinizados, prolongándose este proceso en algunos casos, como en el hombre, durante varios años. Esto hace que el estudio del metabolismo del pollo durante esta etapa pueda aportar luz a los problemas presentados en otros animales, y entre ellos el hombre, en su periodo perinatal.

En cuanto al metabolismo del colesterol, los datos existentes en las distintas especies animales son aún muy confusos y, en algunos

casos, contradictorios. Mientras que existen trabajos que indican que en mamíferos el colesterol es transferido al feto durante la gestación, no se sabe con seguridad si el colesterol del pollo recién nacido ha sido transferido desde la yema del huevo o ha sido sintetizado en los tejidos u órganos del propio animal.

Por todo lo anteriormente expuesto nos pareció de interés abordar el estudio de la regulación de la biosíntesis del colesterol en pollo durante el periodo postnatal, incluyendo en el mismo los días inmediatos a la eclosión en que se supone está finalizando la mielinización a la vez que involucre rápidamente el saco vitelino (hasta 5-6 días aproximadamente) y los días de la vida del pollo a partir de los cuales desarrolla el animal sus propios mecanismos biosintéticos (6-15 días aproximadamente).

Trabajos previos llevados a cabo en nuestro Departamento habían puesto de manifiesto la variación de los niveles de colesterol total, libre y esterificado en distintos órganos de pollo a lo largo de los primeros días de vida, siendo de destacar la inversión que la proporción de colesterol libre / esterificado sufre en el hígado hacia la primera semana de vida, lo cual junto con otros datos, había permitido sugerir que la biosíntesis del colesterol se incrementa en este órgano durante los días 5-8 mientras que en cerebro y otros órganos las variaciones son mucho menos acusadas. Asimismo, las variaciones exhibidas por las actividades enzimáticas implicadas en la fosforilación del ácido mevalónico, fundamentalmente por la mevalonato cinasa, de los mismos órganos de pollo durante el periodo de desarrollo mencionado confirmaban la hipótesis anterior.

Dada la importancia de la HMG-CoA reductasa como enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol, en el presente trabajo se ha procedido al estudio de las variaciones de su actividad a lo largo

del desarrollo postnatal, habiéndose observado un comportamiento semejante al de otras enzimas de esta ruta biosintética, aunque mucho más acusado, lo cual viene a corroborar el papel fundamental desempeñado por la reductasa. Paralelamente a las variaciones de la actividad enzimática se ha estudiado la incorporación de acetato a lípidos insaponificables, como exponente de la biosíntesis de colesterol a partir de este sustrato. Las variaciones observadas a lo largo de la edad están completamente de acuerdo con los cambios exhibidos por la enzima, lo cual corrobora una vez más su importancia en el proceso en estudio.

En cuanto a los sistemas de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa y, por lo tanto, de la síntesis de colesterol, se ha estudiado el efecto de la suplementación del propio colesterol a la dieta de los animales desde el comienzo de su vida. Los resultados obtenidos en este aspecto son muy interesantes por cuanto que se ha demostrado que el colesterol, como producto final de la secuencia biosintética, inhibe completamente la actividad reductasa en hígado, anulando asimismo las variaciones exhibidas en este órgano a lo largo de la edad. Los resultados en asa duodenal son muy parecidos, si bien en este caso los niveles normales de actividad eran muy inferiores a los del hígado. Sin embargo, la actividad reductasa de cerebro no se modifica sensiblemente por efecto de la suplementación de colesterol, poniéndose de manifiesto de esta forma la existencia de un mecanismo diferente para la regulación de la biosíntesis del colesterol a lo largo de la edad en estos órganos.

Conocida la localización microsomal de la HMG-CoA reductasa, hemos considerado de sumo interés establecer la posible relación entre los cambios en la actividad enzimática y la composición lipídica de las membranas microsomales. Aunque tanto el contenido en colesterol como en fosfolípidos de los microsomas presente ligeras variaciones con la edad, la

relación colesterol / fósforo lipídico se mantiene prácticamente constante en los órganos estudiados -hígado, cerebro y asa duodenal- durante las dos primeras semanas de vida. Sin embargo, la suplementación de colesterol a la dieta origina un fuerte incremento en la relación colesterol/ fósforo lipídico de los microsomas hepáticos, mientras que en cerebro dicha relación no se ve modificada y en asa duodenal sufre también un incremento aunque menos pronunciado que en el hígado.

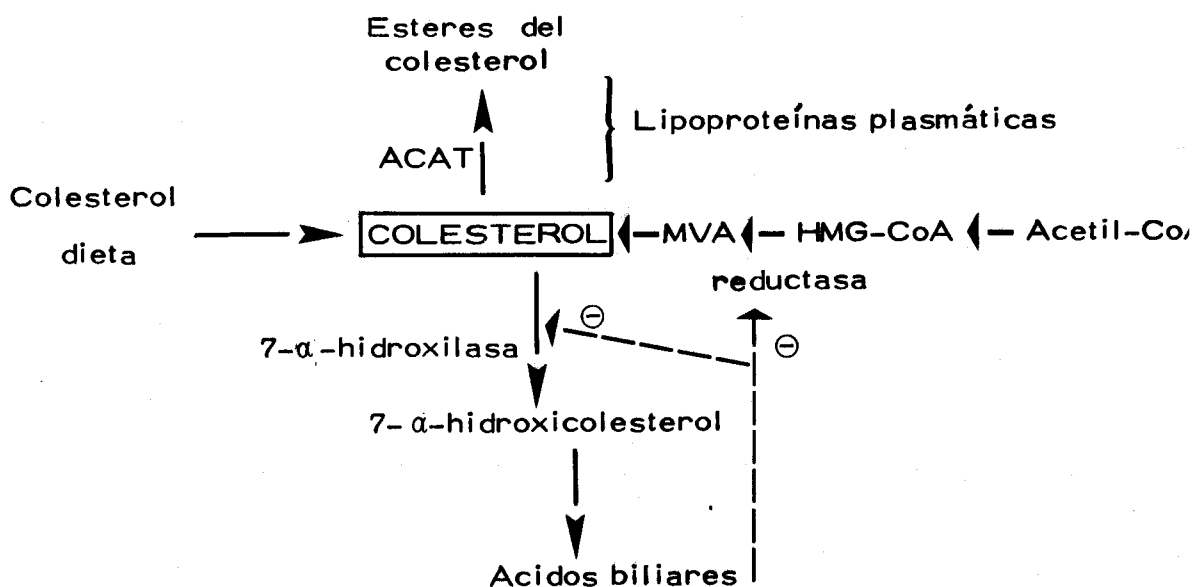
Asumiendo la relación molar colesterol / fosfolípidos como un índice de la viscosidad de las membranas, puede postularse un efecto de la suplementación del colesterol sobre la fluidez de la membrana, explicándose de esta forma su efecto sobre la HMG-CoA reductasa de hígado y no sobre la enzima de cerebro. Nos encontramos, pues, ante un mecanismo de regulación de la actividad reductasa por modificación química de la membrana a la que se encuentra asociada, mecanismo propuesto para otras enzimas microsomales y que puede ser fundamental para la regulación, en su conjunto, de la biosíntesis del colesterol, al menos durante los primeros estadios del desarrollo.

I PARTE TEORICA

1. A. - "TURNOVER" DEL COLESTEROL

El colesterol es un compuesto de importancia vital como constituyente estructural de todas las membranas celulares e intracelulares, actuando además como precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares. Parece ser que se requiere una determinada concentración fisiológica de colesterol para el funcionamiento apropiado de la membrana plasmática.

Por otra parte, el reconocimiento del colesterol como un importante factor en la patogénesis de algunas condiciones clínicas tales como la arteriosclerosis y la colelitiasis ha promovido un gran interés hacia el estudio de su formación, transporte y degradación en el hombre. Los pasos fundamentales del metabolismo del colesterol pueden resumirse en el esquema siguiente:



1. A. 1. - Absorción

El colesterol procedente de la dieta, el excretado y el secretado puede tener coeficiente de absorción diferente. En efecto, en ratas (1) y en pollos (2) se ha encontrado que se absorbe una fracción mayor del colesterol de origen endógeno. En pollos, mientras que el porcentaje de absorción en el intestino delgado del colesterol endógeno fue casi constante (92-97 %) con diversas dietas, el del colesterol total se redujo - a costa de la absorción del colesterol exógeno- cuando se añadió a la dieta colesterol o fitosteroles (2). El colesterol biliar es absorbido esencialmente en el yeyuno, mientras que la absorción del colesterol de la dieta tiene lugar a todo lo largo del intestino delgado, pero sobre todo en su segundo y tercer cuartos (3).

Se piensa que la mayor absorción del colesterol endógeno se debe a que es secretado sobre todo a través de la bilis, en la que ya se encuentra en estado micelar, mientras que el colesterol exógeno debe ingresar en las micelas formadas por ácidos biliares y productos de la hidrólisis de los lípidos de la dieta antes de ser absorbido.

Los mecanismos de la entrada del colesterol desde las micelas a la mucosa intestinal y del transporte a través de las células de la mucosa no se conocen completamente. La migración del colesterol a través de las células parece asociada con la de los ácidos grasos de cadena larga. La síntesis de triglicéridos y la formación de quilomicrones ocurre probablemente en el retículo endoplasmático localizado sobre el núcleo (4, 5). Dentro de la célula intestinal, el colesterol se intercambia entre los quilomicrones y estructuras subcelulares (6). Parte del colesterol de los quilomicrones es esterificado antes de que estos sean secretados

a través de la membrana basal (4, 7).

No se conocen bien los mecanismos que regulan la absorción del colesterol, que se ve afectada por muchos factores. Se ha descrito repetidamente que la magnitud del "pool" de ácidos biliares tiene un gran efecto positivo sobre la tasa de absorción de colesterol, atribuido a su papel en la solubilización micelar del colesterol en el lumen y en su transferencia a la linfa intestinal (8,9). Sin embargo, el hecho de que la adición de taurocolato (4%) a la dieta disminuya el coeficiente de absorción del colesterol, junto con otras observaciones, indica que el mecanismo de actuación de los ácidos biliares no debe ser tan simple (10). En el mismo sentido, la presencia de lípidos no digeribles -como fitosteroles- en la dieta parece deber su efecto hipocolesterolémico a que interfiere la solubilización micelar del colesterol (11).

En el hombre se ha encontrado una relación directa entre la ingesta de colesterol y su absorción (12), pero no entre el colesterol ingerido y los niveles de colesterol plasmático, aunque se acepta que los afecta (13, 14). En ratas, el porcentaje de absorción disminuye con cantidades crecientes de colesterol en dieta (15, 16) y aumenta con altos niveles de grasa en dieta (17).

1. A. 2. - Eliminación

El colesterol eliminado en las heces es la suma de colesterol no absorbido de la dieta, del colesterol excretado y del colesterol secretado externamente (18). Los esteroides pueden sufrir modificaciones y a veces degradación -en hombre, pero no en rata- por la flora intestinal (19).

En el hombre, la eliminación urinaria de colesterol y compuestos relacionados -como las hormonas esteroides- es insignificante en comparación con la pérdida fecal (20). La excreción a través de la piel también es pequeña (21).

La disminución del colesterol sérico y el aumento de colesterologénesis y de síntesis de ácidos biliares observado por algunos autores al sustituir las grasas poliinsaturadas por saturadas en la dieta, parece deberse a la reducción de la circulación enterohepática de ácidos biliares y / o de colesterol a través de un aumento de su excreción fecal (22, 23).

1. A. 3. - Transformación a ácidos biliares

La transformación hepática del colesterol a ácidos biliares es un proceso importante de su recambio, que en la rata parece ser un proceso adaptativo para el mantenimiento de un equilibrio dinámico del colesterol (10). Está regulada por la cantidad de ácidos biliares que vuelven al hígado por la circulación enterohepática, al nivel de la 7α -hidroxilación del colesterol (24), para cuyo curso normal se requiere ascorbato (25). En algunas especies el colesterol ingerido en dieta estimula la formación de ácidos biliares y la excreción fecal de ambos (26). En pollos, la formación de ácidos biliares se incrementa al añadir colesterol o colesteroína a la dieta, y disminuye al añadir taurocolato (27). En cambio, en el hombre, la eliminación fecal de ácidos biliares es similar a la excreción fecal de colesterol en forma de esteroides neutros, pero en la rata ésta es menor (8, 29, 30).

1. A. 4. - Transporte

En animales adultos el colesterol, insoluble en agua, se transporta en el plasma formando parte de lipoproteínas. Una vez absorbido, es incorporado a quilomicrones y VLDL que a través de la linfa se vierten a al sangre llevando la grasa exógena desde el intestino al resto de los tejidos. En estos los triglicéridos de las lipoproteínas son hidrolizados por la lipoproteína-lipasa. El colesterol que finalmente va al hígado, es usado en la formación de lipoproteínas plasmáticas y ácidos biliares.

El hígado sintetiza la mayor parte de las VLDL (31), que transportan triglicéridos a otros tejidos (especialmente el adiposo y el muscular), donde su degradación origina las IDL, que entregan la mayor parte de su colesterol al hígado (32, 33) y son degradadas a LDL (33, 34). Las LDL son el principal vehículo del colesterol en el plasma del hombre adulto, aunque en recién nacidos y en otros animales son las HDL las que llevan un porcentaje mayor del colesterol de la sangre (35, 36).

Las HDL, que se sintetizan en hígado e intestino (33, 34) proporcionan colesterol esterificado a VLDL y LDL por medio de la reacción de la lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT), que parece actuar fundamentalmente en plasma. El colesterol libre de las HDL es utilizado con preferencia al de las LDL como fuente de colesterol biliar (37) y de ácidos biliares (38) en el hígado, lo que, junto al papel asignado a las HDL en la salida del colesterol de las células, sugiere para las HDL un papel de lanzadera de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, para su eliminación. Se ha sugerido que la esterificación del colesterol catalizada por la LCAT puede facilitar este proceso, pero en cultivos de fibroblastos y de células musculares lisas la actividad LCAT no era indispensable para la

liberación de colesterol de las células (39). El colesterol libre es intercambiado rápidamente entre las diferentes clases de lipoproteínas, y más lentamente con las membranas superficiales de la mayoría de los tejidos.

Aparte de la LCAT, en la esterificación del colesterol están implicadas la colesterol esterasa, que actúa fundamentalmente (en el sentido de la hidrólisis) en el tubo digestivo y cerebro y no requiere ATP ni CoA, y la acil-CoA: colesterol acil transferasa (ACAT) que sí los requiere y se encuentra sobre todo en el retículo endoplasmático del hígado y la glándula adrenal. La regulación de este proceso y el papel fisiológico de la LCAT e incluso de los ésteres de colesterol no están resueltos. Se ha sugerido que los ésteres de colesterol (que predominan en las LDL y HDL) pueden ser una forma de transporte para el colesterol o para los ácidos grasos esenciales, también pueden ser una forma provisional de almacenamiento, pues se presume que el colesterol libre puede difundir fácilmente de las células al fluido intercelular.

En cuanto al mecanismo de penetración del colesterol en los tejidos, una posibilidad es que las partículas de lipoproteínas puedan entrar en las células por pinocitosis, como lo sugieren estudios bioquímicos (40, 41) y autorradiográficos con microscopio óptico o electrónico. (42). Parece que la transferencia de colesterol libre desde el plasma, que se demostró en los glóbulos rojos (43, 44), ocurre en todos los tejidos.

Muy recientemente (45) se ha descrito un sistema de endocitosis específica para la "ingestión" del colesterol sanguíneo por parte de las distintas células del organismo. Cuando las células se hacen deficitarias en colesterol sintetizan una glucoproteína particular que se inserta en la membrana plasmática comportándose como un receptor de las LDL. Al unirse las LDL a sus receptores, se produce una difusión a través de la mem-

brana, concentrándose y formando invaginaciones que posteriormente originan vesículas cerradas muy ricas en colesterol.

Se ha observado una relación recíproca entre ésteres de colesterol y síntesis de colesterol en cultivos de fibroblastos, de linfocitos y de células musculares lisas (46, 47, 48) y en la glándula adrenal (49). En fibroblastos humanos los ésteres de colesterol se forman cuando hay exceso de colesterol y se hidrolizan cuando el suministro de colesterol es limitado, mientras que el contenido de colesterol libre permanece constante (36, 50).

1. B. - SINTESIS DEL COLESTEROL .

LOCALIZACION TISULAR

Usando técnicas "in vitro" todos los órganos probados han mostrado capacidad para sintetizar colesterol. Sin embargo, el hígado es el órgano más importante para la biosíntesis de colesterol en animales adultos (51). En experimentos "in vitro", el hígado exhibió la mayor tasa de síntesis de esteroides a partir de diversos precursores, síntesis que se afectaba notablemente por el tipo de dieta y era inhibida por el ayuno o la ingesta de colesterol (52).

Las experiencias en que se deprime la reabsorción de ácidos biliares por ingestión de colestiramina o por fistula o ligadura biliar (53) indican que el hígado debe ser el sitio de biosíntesis activa en las situaciones fisiológicas en que se produce una reducción parcial o total de la cantidad de ácidos biliares reabsorbidos, lo que sugiere que éstos (tal vez solo algunos) actúan como permanentes inhibidores fisiológicos de la síntesis hepática de colesterol.

Por otra parte, se ha estimado que la cantidad de colesterol que, sintetizada por el tracto digestivo y secretada al lumen es reabsorbida, es casi 1 / 3 de la secreción interna total en la rata (1). Más recientemente se ha demostrado indirecta (54-55) y directamente (56) que el tracto digestivo-especialmente el intestino- es responsable de al menos el 56 % de la biosíntesis de colesterol en ratas machos adultos.

La colesterogénesis en el intestino delgado parece controlada por la concentración luminal de ácidos biliares (como inhibidores) (57),

mientras que sobre el efecto inhibitor del colesterol intestinal hay controversia (57, 58, 59). Se ha sugerido que la colesterogénesis intestinal en rata puede estar relacionada inversamente con el coeficiente de absorción (54), que depende de factores como la concentración de ácidos biliares y colesterol en el lumen.

En un trabajo realizado recientemente se apunta que, la colesterogénesis intestinal parece estar controlada por una complicada red de ingredientes de la dieta (60).

La síntesis del colesterol y su ésteres en el cerebro parece tener una particular importancia durante el desarrollo, por su relación en el proceso de mielinización.

Aunque el colesterol está ampliamente distribuido en varios tejidos del organismo, este se encuentra en una concentración muy alta dentro del sistema nervioso central y periférico. La relación de colesterol por peso de tejido seco en cerebro es de alrededor del 10 %, mientras que en otros órganos es de 1 %. La cantidad encontrada no varía fácilmente con el "estado" nutricional del animal adulto (61).

Se sabe que el componente mayoritario de la fracción lipídica de la mielina es el colesterol (62, 63). El interés que tiene la colesterogénesis en el sistema nervioso surge de su requerimiento para la formación de la vaina de mielina. Solo el colesterol libre esta presente en el cerebro maduro, pero el colesterol esterificado se ha encontrado durante los primeros estados del desarrollo (64). Este hecho junto con demostraciones histológicas de la presencia de ésteres de colesterol en el desarrollo de la mielina en cerebro ha hecho ver que el colesterol esterificado

es un precursor del colesterol libre en la mielina. Dado que virtualmente todo el colesterol de cerebro se origina "in situ" esto implica que el colesterol esterificado es sintetizado en cerebro y luego hidrolizado en el curso de la deposición del colesterol libre en mielina (65).

Antes de la mielinización el cerebro contiene relativamente poco colesterol, siendo su composición similar a la de otros tejidos del cuerpo. No obstante durante este periodo la mielina se está acumulando, pudiéndose apreciar pequeñas gotitas de lípidos entre el tejido nervioso. Este fenómeno ocurre en el embrión de pollo hacia el día 16 de incubación (64). Por otra parte se ha demostrado que el desmosterol representa un 2 % del contenido en esteroides de todo el embrión. De igual manera se sabe que el desmosterol es rápidamente convertido en colesterol en cerebro de pollo, donde es probable que sea un importante precursor del colesterol. No obstante, aunque el colesterol esterificado se ha encontrado en gran cantidad en cerebro de embrión de pollo solo un 6 % de este aparece a los 30 días de la eclosión del huevo (64). Esto hace suponer que el colesterol esterificado puede jugar un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central.

En mamíferos, los ésteres de colesterol así como el desmosterol, se encuentran en concentración relativamente elevada en el cerebro antes y al comienzo de la mielinización y son casi indetectables cuando la mielinización es completa. El descenso de la concentración de desmosterol se debe también a un brusco aumento de actividad de la desmosterol reductasa al comienzo de la mielinización (66). Una particular asociación de los ésteres de colesterol con la glía sugiere la relativa abundancia de aquellos en tumores de glía, así como el hecho de que el periodo de proliferación glial en el desarrollo cerebral ocurre antes y al comienzo de la mielinización.

Estos datos condujeron a Volpe y col. (67) a la hipótesis de que en las células gliales antes de la mielinización, hay una concentración relativamente alta de desmosterol que estimula la síntesis de ésteres de colesterol y conduce a la acumulación de éstos. Al comienzo de la mielinización activa, cuando la demanda de colesterol glial se hace grande, aumenta la conversión de desmosterol a colesterol gracias al aumento en actividad desmosterol reductasa. Así se retiraría un potente inductor de la esterificación del colesterol y un inhibidor de la síntesis de colesterol (el colesterol es un inhibidor mucho menos efectivo de la HMG-CoA reductasa de las células gliales que el desmosterol (68). El resultado es un aumento en colesterol disponible para la mielinización y un descenso en éster de colesterol glial. Es posible que juegue algún papel un aumento en la hidrólisis de ésteres de colesterol en las células gliales, ya que en cerebro entero hay un aumento brusco de actividad colesterol éster hidrolasa al comienzo de la mielinización activa (69).

Las variaciones a lo largo del desarrollo en la magnitud de los procesos de "entrada" y "salida" (incluyendo síntesis y transformación) en un órgano se reflejan en cambios de su contenido en colesterol. En general, los niveles de colesterol en suero y tejidos aumentan con la edad en seres humanos (70) y en mamíferos (71), a la vez que se producen cambios en el metabolismo del colesterol, disminuyendo la actividad de todos los procesos que afectan a su recambio. En humanos aumenta la concentración de β -lipoproteínas (LDL) con la edad, y disminuye la de α -lipoproteínas (HDL) (72).

El nivel de colesterol esterificado aumenta en algunos tejidos con la edad en mayor grado que el libre, lo que se ha explicado suponiendo un descenso de actividad colesterol éster hidrolasa, ya que la salida de

colesterol esterificado de una célula depende de la hidrólisis previa del éster (73). Los niveles de colesterol libre y total en el hígado de ratas lactantes no son diferentes de los niveles del adulto.

La susceptibilidad a la deposición de colesterol varía ampliamente entre los órganos. Niveles altos de colesterol sérico pueden originar un acúmulo excesivo de colesterol en algunos tejidos, al menos en algunas especies de animales. El "stress" produce un aumento en el nivel de colesterol de aorta, hígado y suero de rata; en el riñón hay un aumento transitorio (74). No siempre hay una relación entre los cambios en los "pools" de colesterol de los tejidos y del plasma.

1. C. - ASPECTOS PARTICULARES DEL
METABOLISMO DEL COLESTEROL
EN AVES

En términos generales, se han establecido características comunes y diferenciales en el metabolismo en mamíferos y aves. Cualitativamente, la mayoría de las vías metabólicas son similares, pero hay importantes diferencias cuantitativas en las actividades relativas de alguna de esas vías y de enzimas individualmente consideradas.

Hay algunos trabajos que indican que el colesterol de los mamíferos en gestación es transferido al feto (75). En aves, parece ser que la mayor parte del colesterol de la yema del huevo procede de la sangre de la gallina ponedora (76). Sin embargo no se sabe con seguridad si el colesterol de los tejidos de pollo recién nacido ha sido transferido desde la yema de huevo o ha sido sintetizado en los tejidos del polluelo o en las membranas embrionarias.

En estudios sobre los niveles de colesterol libre y esterificado en el huevo completo, Tsuji y co. (77) concluyendo que no existía síntesis de colesterol en el embrión, sino que el colesterol de la yema se esterificaba y era transportado al embrión. Sin embargo Goodrige (78) encontró una pequeña síntesis de colesterol a partir de acetato en hígado de embrión de pollo. Otros investigadores sostienen así mismo que en el embrión debe ocurrir, al menos en parte, la biosíntesis del colesterol (79-81). En 1969 Connor y col (82) llegaron a la conclusión de que en pollitos recién nacidos procedentes de huevos de gallinas inyectadas con colesterol-4-¹⁴C la radiactividad específica del colesterol en intestino, hígado, suero, corazón y músculo esquelético es de 95-98 % del de la yema, siendo

la del cerebro sólo del 11 %. Estos resultados indican que la mayor parte del colesterol del pollo se origina a partir del saco vitelino, mientras que la biosíntesis del colesterol era activa en el cerebro y proporcionaba alrededor del 90 % del contenido de su propio colesterol.

La eclosión es análoga al destete de los mamíferos en el sentido de que ambos representan el paso final hacia la vida independiente y el cambio de una dieta rica en grasas y en proteínas, en el caso de la leche materna de la rata- a otra con mucho menor contenido en grasas y mayor contenido glucídico. La actividad lipogénica aumenta rápidamente en el hígado de ratas y pollos en esta etapa, y muchas actividades enzimáticas implicadas en la lipogénesis emergen a la vez tanto en órganos del pollo como en los órganos correspondientes de la rata (78, 83, 84). La utilización del glucógeno depositado durante la vida embrionaria en hígado de pollo y de rata empieza en esta tras el nacimiento y en aquél antes o durante la eclosión (85). Durante la última semana de incubación, el cerebro de pollo parece experimentar un periodo crítico de maduración morfológica y funcional (en el que se piensa que comienza la mielinización) análogo al de la última semana de lactancia de la rata y al del final de la gestación del cobaya (84).

Respecto a la cantidad de colesterol total, libre y esterificado en hígado de pollitos recién nacidos, se ha demostrado un descenso estadísticamente significativo a los días 5 y 10 después de la eclosión (86), de donde parece deducirse que la situación en el periodo postincubación difiere del periodo embrionario. En efecto, la proporción colesterol esterificado / colesterol libre disminuye con el tiempo llegando a ser la cifra de colesterol libre algo superior a la del esterificado en pollo de 10 días. Estos

resultados coinciden con los de Deuel (87) quién afirma que, en el pollo adulto la proporción de colesterol esterificado en el hígado es sólo de un 7 % del total. Todo ello hace suponer que el éster del colesterol cumple una función única en el embrión, bajando la proporción de éster cuando el pollo desarrolla sus propios mecanismos para la síntesis del colesterol.

Según Teekell y col (88) la adición de colesterol (2%) y ácidos grasos (6 %) a la dieta produce un aumento significativo en los niveles de colesterol libre en hígado y aorta de pollo. Aproximadamente el 64 % del colesterol en sangre está en forma esterificada, mientras el 72 % en hígado y aorta está en forma libre. El colesterol en hígado y aorta es principalmente de origen endógeno. Se observó que los machos tienen unos niveles de colesterol libre más altos que las hembras (88).

El contenido en colesterol de diversos tejidos de gallos de 2 años de edad alimentados con una dieta normal es sorprendentemente similar al de los tejidos correspondientes de los mamíferos, salvo en el cerebro, en los pollos es mucho más bajo (89). Esta excepción puede deberse a alguna diferencia en la estructura del cerebro de pollos y mamíferos. El contenido de colesterol en hígado, riñón y cerebro (en g/ 100 g de tejido seco) era aproximadamente, 1, 1.5 y 3 en pollos (89) y de 1, 1.5 y 10 en ratas y otros mamíferos (90)

En pollo y otros animales, una dieta rica en colesterol eleva los niveles de éste en suero, hígado, riñón, aorta y otros tejidos, pero no en cerebro (89, 90, 91). La resistencia del tejido cerebral a la excesiva deposición de colesterol puede deberse a la barrera cerebral de la sangre, que bloquea el paso desde el sistema vascular al parénquima cerebral (92), y al lento recambio del colesterol en el cerebro maduro (93).

La alimentación con una dieta rica en glúcidos no afecta a la concentración de colesterol en plasma (94). El colesterol en plasma esta descrito como el factor fundamental de riesgo asociado con la aterosclerosis (95).

En comparación con los gallos, las gallinas ponedoras de 2 años de edad (ambos con dieta normal) tienen una ligera hipercolesterolemia y un contenido bajo en colesterol en la mayoría de los tejidos estudiados, mientras en la aorta el nivel es mucho mayor, con aterosclerosis ligera. Las no ponedoras tienen una fuerte hipercolesterolemia, aterosclerosis severa, y un nivel de colesterol algo mayor en la mayoría de los tejidos (89). Ho y col. (96) encontraron que el recambio diario de colesterol en las gallinas ponedoras era tres veces mayor que el de los gallos, y procedía esencialmente de síntesis endógena.

La presencia de esteroides vegetales en la dieta de los pollos reduce la absorción de colesterol y ácido biliares, y la concentración de colesterol en plasma e hígado (97). Cuando las gallinas consumen esta dieta la concentración de colesterol de la yema de huevo disminuye significativamente, aunque no varían el tamaño del huevo y de la yema, el peso de la cáscara ni la producción de huevos. (98).

Hwang y col (99) han estudiado el efecto de diversas sustancias antihipercolesterolemicas como colestiramina, esteroides de soja, etc., en pollos normales e hipercolesterolemicos alimentados con una dieta suplementada con vitamina A o β -caroteno. Encontraron que estas sustancias antihipercolesterolemicas no sólo pueden afectar a la absorción y síntesis del colesterol y a la eliminación de ácidos biliares, sino también a

los niveles de vitamina A en hígado.

Uno de los aspectos más interesantes del metabolismo del colesterol es la producción de hormonas esteroideas (sexuales y corticosteroides). En embrión de pollo, los andrógenos se sintetizan tres días antes de la diferenciación morfológica de las gónadas (100). La producción de andrógenos por las gónadas ya diferenciadas comienza a los seis días y medio de la incubación del huevo, siendo los testículos las gónadas de mayor producción seguidos por el ovario izquierdo a partir de los nueve días y medio de la incubación.

La concentración global en el plasma de embrión de pollo de las hormonas progesterona, corticosterona, cortisol y cortisona se incrementa continuamente durante la última mitad del periodo de incubación, disminuyendo después del nacimiento (101). Kalliecharan y Hall (102) concluyeron que varias hormonas corticosteroides se sintetizan en las glándulas adrenales y se secretan durante el desarrollo embrionario.

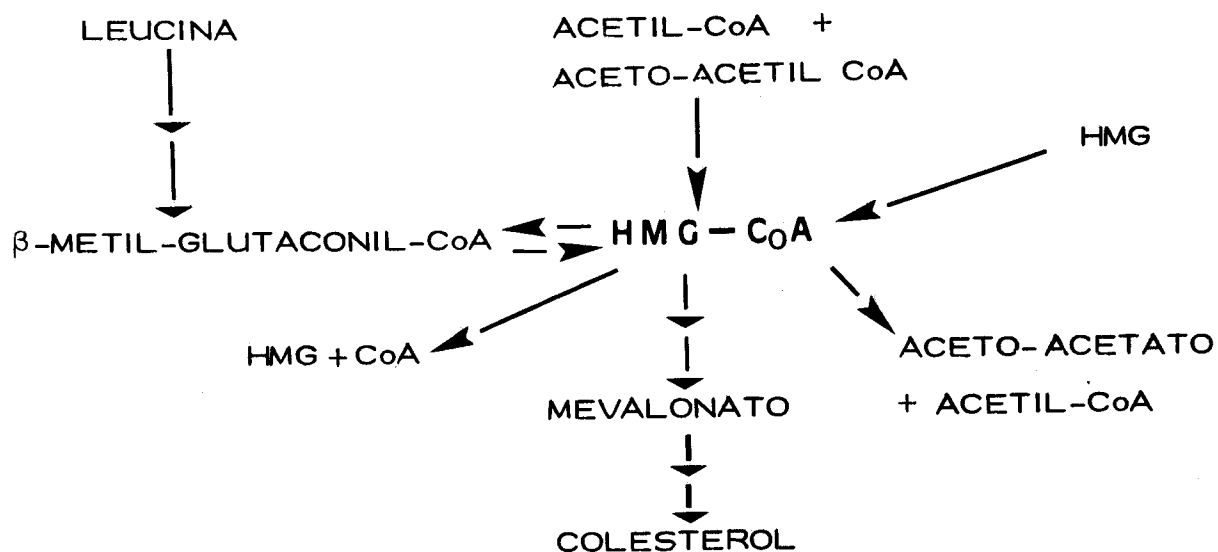
1. D. - IMPORTANCIA DE LA HMG-CoA
REDUCTASA EN LA BIOSINTE-
SIS DEL COLESTEROL

La ruta de biosíntesis enzimática del colesterol a partir del acetato empezó a estudiarse en los años 40 y hoy se conoce con cierto detalle, gracias a las aportaciones de Bloch, Conforth y Popják fundamentalmente, E. D. Beytia y J. W. Porter (103) hicieron una evaluación crítica de las investigaciones más recientes sobre las reacciones que dan lugar a la formación de los compuestos isoprenoides.

El acetyl-CoA es un sustrato común a la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos. Para el control de la biosíntesis del colesterol son importantes los mecanismos de regeneración del acetyl-CoA extramitocondrial, por lo que un punto de control es el paso del acetyl-CoA procedente de la oxidación de ácidos grasos y descarboxilación oxidativa del piruvato -proceso que tiene lugar dentro de la mitocondria- a través de la membrana mitocondrial por la lanzadera del citrato principalmente (104).

Dos moléculas de acetyl-CoA se unen para formar acetoacetyl CoA, reacción que está catalizada por una tiolasa en la fracción microsomal. La síntesis del 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA a partir de acetoacetyl CoA y acetyl-CoA está catalizada por la HMG-CoA sintetasa en la fracción soluble.

El HMG-CoA así formado participa en varias vías metabólicas:



La formación de ácido mevalónico requiere la reducción del HMG-CoA por la HMG-CoA reductasa.

El paso de MVA a isopentenil pirofosfato es catalizado por tres enzimas: mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa. La descarboxilación del PP-MVA catalizada por esta última parece ser otro punto de control importante en la síntesis del colesterol (105). El MVA (al parecer transformándose primero en dimetil-PP por esta vía) también puede servir como sustrato para la síntesis de cuerpos cetónicos y de ácidos grasos de cadena larga, en un desvío ("shunt") de la ruta conducente a esteroides (106).

La biosíntesis de pirofosfatos alílicos implica la isomerización del isopentenil-PP (Ip-PP) a dimetil-alil-PP y la condensación cabeza-cola de Ip-PP y dimetil-alil-PP para dar sucesivamente geranil o neryl-PP (trans o cis, C₁₀) y farnesil-PP (C₁₅). La condensación de dos moléculas de farnesil-PP da un intermediario C₃₀, preescualén-PP, el cual

es convertido en escualeno en presencia de NADPH; ambas reacciones son llevadas a cabo por el mismo sistema enzimático (103). La reacción de formación del lanosterol tiene lugar en los microsomas pero con la participación de dos proteínas citoplasmáticas portadoras de esteroides. Desde el lanosterol se puede formar colesterol pasando por el desmosterol o por el 7 -dehidrocolesterol.

De todas las reacciones mencionadas, la transformación de HMG-CoA a MVA es la etapa mejor controlada y sobre la que parece descansar, fundamentalmente, la regulación de la biosíntesis del colesterol.

La enzima HMG-CoA reductasa presenta dos aspectos importantes que justifican el interés de su estudio. En primer lugar, el hecho de actuar como llave o punto clave en la regulación de la biosíntesis de colesterol (107, 108, 109, 110, 111, 112) observándose un aparente defecto en la regulación de la reductasa en procesos de hipercolesterolemia y tumores hepáticos. Esto hace que los esfuerzos de los investigadores se vuelquen en el conocimiento de la regulación de este enzima, aplicable luego al diagnóstico y posiblemente a la terapia de enfermedad del corazón y de cáncer.

En segundo lugar, también en mamíferos, la biosíntesis de la enzima esta fuertemente regulada por la dieta, hormonas y multitud de factores tanto internos como externos, lo que hace lógico su estudio bioquímico.

1. D. 1.- La HMG-CoA reductasa como factor limitante

Diversos estudios sobre las propiedades de la HMG-CoA reductasa de hígado e intestino de rata indican que ambas enzimas son similares: ambas presentan ritmo circadiano (113, 114) tienen cinéticas similares (3), requieren NADPH (115) y reaccionan con anticuerpos de reductasa de

hígado (116). Otros autores han indicado que la HMG-CoA reductasa es el factor limitante y llave que regula la reacción de síntesis de colesterol en hígado durante el desarrollo pre y postnatal de rata, mientras que en cerebro la reductasa es factor limitante en la síntesis de esteroides solo después de los 11 días de edad. Antes de este tiempo, no hay correlación entre la síntesis de esteroides y la actividad reductasa (117). Por otra parte, también Siperstein (108) demuestra que la velocidad de síntesis de colesterol en hígado de mamíferos está controlada por la enzima HMG-CoA reductasa (118).

Así pues podemos concluir que en condiciones fisiológicas normales, la HMG-CoA reductasa cataliza el punto limitante de la síntesis de esteroides hepáticos (119).

La actividad reductasa se corresponde estrechamente con la síntesis de colesterol en una gran variedad de condiciones. La capacidad sintética del colesterol hepático fue variada alrededor de 100 veces, por manipulaciones de la dieta. En cada instante la correlación entre la síntesis de colesterol y actividad reductasa fué sorprendente. (120).

1. D. 2. - La HMG-CoA reductasa como lugar de regulación

Según los resultados de Shaphiro y Rodwell (119), se puede concluir claramente que la reductasa es el "locus" para la regulación "feed-back" del colesterol. Esta idea comenzó con los estudios en levaduras sobre la biosíntesis de esteroides permitiendo (118) localizar el lugar de la regulación por dieta de colesterol en mamíferos, como un lugar anterior al mevalónico y por deducción, posterior al HMG-CoA. Puesto que la conversión de HMG-CoA a MVA está catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa, se enfocó la atención en ella como centro de la regulación de la biosíntesis de colesterol

En estudios posteriores se ha visto que esta conclusión, aunque fue supuesta sin demasiados fundamentos, es en sí misma válida. La HMG-CoA reductasa es bajo muchas condiciones fisiológicas, la llave en la regulación enzimática de la colesterogenesis hepática (121).

1. D. 3. - Regulación en otros puntos de la ruta biosintética

Los enzimas acetil-CoA tiolasa y HMG-CoA sintetasa, las dos mitocondriales y extramitocondriales, están presentes en tejidos hepáticos. Ambas están relacionadas con la formación de cuerpos cetónicos y la sintasa con la biosíntesis de colesterol. Las actividades extramitocondriales tiolasa y sintasa se han descrito que disminuyen con una alimentación rica en colesterol (122, 123, 118), aunque esto no se ha observado universalmente. De todas formas estas variaciones son bajas e incompletas.

En un tiempo largo, probablemente estas actividades decrecen a niveles suficientemente bajos como para cortar la síntesis de HMG-CoA. Esto serviría para diversificar un importante intermediario (acetil-CoA) de una ruta muerta.

Por otra parte, la alimentación rica en colesterol disminuye la conversión de MVA en farnesil pirofosfato y la conversión de este en escualeno (124). Entre las enzimas que disminuyen después de un ayuno e incrementan tras la realimentación se incluyen la pirofosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfatasa isomerasa, dimetilaliltransferasa y escualeno sintasa (125). Aunque estos cambios en actividad son pronunciados, no son tan intensos o rápidos como los cambios en la actividad HMG-CoA reductasa o en la síntesis de colesterol. Los lugares de regulación anteriores

o posteriores a la enzima HMG-CoA reductasa parecen en este caso, ser de importancia secundaria.

1. D. 4. - Distribución de la HMG-CoA reductasa

Aunque la HMG-CoA reductasa se encuentra presente en todos los tejidos capaces de sintetizar isopentenil pirofosfato, la actividad se ha descrito solo en hígado, intestino, leucocitos, piel, linfocitos, cerebro y células de tumores hepáticos (118). La actividad reductasa también se ha medido en fibroblastos de piel humana (126), leucocitos humanos (127) y en biopsias de hígado humano (118).

La HMG-CoA reductasa también está presente en levaduras Neurospora, y en ciertos géneros de bacterias incluyendo Pseudomonas y en actinomicetos.

En células de mamíferos la HMG-CoA reductasa se encuentra exclusivamente en la membrana de la fracción microsomal de los homogenizados celulares. Sobre un 80 % parece estar asociado con la fracción membranosa constituida por el retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y membrana plasmática (128).

En un trabajo más reciente, se apunta que la distribución submicrosomal de la HMG-CoA reductasa junto con una enzima degradativa del colesterol como es la colesterol 7α -hidroxilasa se encuentran en el retículo endoplasmático sugiriéndose que la reductasa se presenta en el retículo endoplasmático con un alto contenido en ribosomas (129).

1. D. 5. - Ensayo de la actividad HMG-CoA reductasa

La cuantificación de la actividad reductasa microsomal de mamíferos no es tan sencilla como en un principio pudiera pensarse. La baja actividad reductasa y su inclusión en la fracción membranosa con enzimas que rápidamente oxidan el NADPH, hizo frustrar en repetidas ocasiones el intento de ensayar la actividad por medida de la oxidación del NADPH. No obstante a pesar de las dificultades en su detección, varias técnicas nuevas permiten precisarla y cuantificarla (118).

- Ensayo colorimétrico. Un método colorimétrico que utiliza el reactivo de Ellman para medir la liberación de coenzima A, aunque rápido y adecuado, es menos sensible que el método isotópico más comúnmente empleado (130), por lo que no puede utilizarse satisfactoriamente para la determinación de actividades bajas de reductasa. Por otra parte la concentración de DTT (0.2 mM) que puede mantenerse no es la adecuada, ya que Heller y Gould (131) indican que una concentración 10 mM logra la máxima expresión de la actividad reductasa tanto en microsomas como en preparaciones de reductasa solubilizada. Estas restricciones limitan grandemente el uso de este ensayo colorimétrico.

- Ensayo radioisotópico. Por varias razones técnicas, el método más usado para medir actividad reductasa de mamíferos, es la incorporación de la radiactividad del sustrato ^{14}C -HMG-CoA al producto MVA durante 10-60 minutos de incubación a 37°C. Comúnmente se incluye un estándar interno de ^3H -mevalonato para permitir las correcciones de las pérdidas ocurridas durante la secuencia de aislamiento del ^{14}C -MVA formado. La mezcla

de la reacción se acidifica para inactivar el enzima reductasa y convertir el MVA en su δ -lactona. El sustrato y producto se separan por técnicas cromatográficas cuantificándose por espectroscopía de centelleo líquido. Huber y col. (132) defienden las columnas pequeñas con resina de intercambio aniónico para la separación cromatográfica. No obstante la cromatografía en placas de silicagel G activado, desarrolladas en benceno: acetona 1:1 (v/v) se emplea más normalmente (133).

La incubación de pequeños volúmenes (50-250 μ l) facilita el análisis de la actividad HMG-CoA reductasa, particularmente cuando la cantidad de material disponible para el ensayo es limitado por ejemplo, en cultivos celulares (126, 134, 135).

Usando pequeños volúmenes también se facilita el aislamiento del MVA radiactivo por permitir su aplicación directa en placas de capa fina, Shapiro y col. (135). De esta forma se elimina la extracción con éter anterior a la cromatografía, con este método se han podido medir menos de 30 pmoles, de mevalonato formado.

Recientemente se ha dado a conocer un nuevo método que no requiere separación cromatográfica, utilizando el sustrato marcado con ^3H (136).

Por otra parte, la actividad reductasa microsomal de hígado de rata varía según los laboratorios. Pero estas diferencias no podemos atribuir las solamente a factores fisiológicos conocidos, de aumento o disminución de la actividad reductasa, sino más bien a variaciones en la técnica de ensayo y sobre todo a las diferencias en la composición de los tampones usados durante el aislamiento de los microsomas. De esta manera se

han observado variaciones de hasta 10 veces, de la actividad reductasa utilizando diferentes tampones. De todas formas, cada autor tiene su fórmula favorita, no encontrándose un tampón óptimo entre los usados corrientemente. (118).

1. D. 6. - Ritmo diurno de la HMG-CoA reductasa

La existencia del ritmo diurno en la HMG-CoA reductasa fue observada por primera vez en hígado de ratón (117) y escasamente después en hígado de rata (133, 137), en intestino de rata (115) y en ciertos hepatomas de ratas y ratones (138). Esto ha sido demostrado repetidamente en muchos laboratorios. No obstante, las variaciones rítmicas de la reductasa en otras especies, particularmente en humanos, o en otros tejidos no han sido establecidas. De las enzimas que catalizan la conversión de acetato a escualeno solamente la HMG-CoA reductasa presenta un ritmo diurno (125). Tan solo otra enzima del metabolismo del colesterol, la colesterol 7 α -hidroxilasa, se conoce que presente ritmo. Esta enzima cataliza la primera reacción del catabolismo del colesterol a ácidos biliares (118). Las causas del ritmo parecen deberse a una variación en la síntesis (117, 133, 137, 139, 140) y en la degradación de la enzima HMG-CoA reductasa (139).

Otras causas del ritmo pueden ser los cambios en la luz y en la alimentación (141). Por último el ritmo está regulado por diversas hormonas, unas que favorecen la síntesis o actividad de la enzima y otras su degradación o inhibición.

1. D. 7. - Cambios de la HMG-CoA reductasa durante el desarrollo

Los únicos estudios llevados a cabo hasta el momento sobre

este tema han utilizado como animales de experimentación mamíferos y, más concretamente la rata.

La HMG-CoA reductasa se caracterizó por pertenecer a un grupo enzimático presente en el feto avanzado y en el recién nacido (118, 142).

Su actividad en hígado de rata es muy alta justo antes de nacer; durante la primera semana los valores son aproximadamente los del adulto, disminuyendo hasta el final de la lactancia. En el tiempo que sigue al destete, alrededor del día 22, la actividad asciende casi al doble que la del adulto normal, manteniéndose en estos niveles durante una semana y volviendo a declinar con posterioridad a los niveles normales del adulto. Dado que la síntesis de colesterol total muestra una gran similitud a lo largo del desarrollo (118), la HMG-CoA reductasa parece ser el factor limitante de la biosíntesis de colesterol en hígado tanto durante el desarrollo como en ratas adultas.

En un trabajo más reciente se apunta que tanto la biosíntesis de colesterol a partir de acetato, mevalonato o escualeno como la actividad HMG-CoA reductasa, en ratas viejas fueron menores que en ratas jóvenes. Sin embargo, la síntesis de colesterol en ratas viejas no difiere de las jóvenes durante una situación de ayuno (143).

- La posible explicación del comportamiento del hígado de rata a lo largo del desarrollo sería por una parte, la presencia de colesterol en la leche materna (6 mg de colesterol por gramo de sólidos) y su ausencia en la comida normal de la rata. Esto puede hacer bajar la actividad reductasa durante la lactancia y aumentarla en el tiempo que sigue al destete. Por otra



parte , se ha visto que la leche de rata y el hígado de ratas lactantes, contienen compuestos que inhiben la actividad HMG-CoA reductasa microsomal de hígado de ratas adultas medida "in vitro." La complejidad de los cambios de la reductasa en hígado de rata durante el desarrollo parece pues, estar causada principalmente por factores de la dieta. Aunque estos factores pueden influir en la cantidad de síntesis o degradación de la reductasa, también parece regular los niveles hepáticos de un inhibidor de la actividad enzimática (142).

El cambio a lo largo del desarrollo de la síntesis de colesterol en cerebro ha sido estudiado por Kendutsch y Sancier (144). Estos investigadores encuentran un máximo en la síntesis a los 11 días después del nacimiento de la rata seguido de un lento declive. En otros estudios sobre el mismo tema en cerebro de rata, Aragon y col. (145) encuentran dos picos de actividad reductasa, uno el día 10 y otro el día 20 inmediatamente después del destete. Los mismos autores indican que la actividad específica en ratas adultas se mantiene en niveles 2 ó 3 veces inferiores a los exhibidos en ratas recién nacidas. Estos resultados difieren de los encontrados por Ness (146) según el cual el máximo de actividad reductasa corresponde al día 4 y luego desciende gradualmente. Los bajísimos niveles de actividad reductasa en rata adulta están más de acuerdo con anteriores trabajos (107) sobre la cantidad de acetato incorporado a colesterol. En estos estudios se puso de manifiesto que, la síntesis de colesterol es muy reducida en ratas adultas y en algunos casos no fue detectado.

En la mucosa intestinal la actividad específica de la HMG-CoA reductasa no varía en función de la edad o sexo de las ratas. Esta diferencia con los demás órganos mencionados pueden ser debidas a un distinto mecanismo de control operativo sobre la regulación en la actividad de la enzima (115).

1. E. - REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Los mecanismos por los cuales la enzima HMG-CoA reductasa cambia de actividad han recibido gran atención en los últimos años (147). El hecho de ser la enzima fundamental sobre la que se centra la regulación de la biosíntesis del colesterol hace que su actividad se vea influenciada por una serie de muy diferentes factores dirigidos, en último extremo, a afectar la propia síntesis de colesterol. Sin embargo en aras de la concisión, podríamos establecer varios tipos de mecanismos por los que puede verse afectada la enzima.

1. E. 1. - Modulación covalente

Se trata de aquellos mecanismos mediante los cuales se modifica la actividad enzimática sin que se vea afectado el número de moléculas existentes, correspondería a los mecanismos conocidos actualmente bajo el nombre de modulación covalente.

Aunque hasta hace relativamente pocos años solo existían indicios de una regulación de la actividad en la HMG-CoA reductasa por modificaciones químicas, los resultados obtenidos recientemente permiten asegurar que esta enzima está sometida a un mecanismo de modificación post-transcripcional mediante la interconversión de las formas activa e inactiva de la misma.

Ya en 1973 (148). Beg. y col. mencionaban que la reductasa hepática se inactivaba "in vitro" cuando los microsomas se incubaban con la fracción citoplasmática en presencia de ATP y Mg^{2+} .

Una inactivación semejante ATP-dependiente se demostró en fibroblastos humanos y era catalizada por una enzima citoplasmática (149). Posteriormente, Nordstrom y col. hacen la importante observación de que la HMG-CoA reductasa inactivada en una reacción ATP-dependiente, podía reactivarse mediante incubación con una enzima citoplasmática procedente de hígado de rata, en presencia de EDTA. La actividad de esta enzima era totalmente inhibida por FNa 50 mM, un inhibidor de fosfatasa, sugiriendo que la reactivación incluía una defosforilación de la enzima previamente fosforilada (150).

Gibson y colaboradores han señalado que la reactivación de la HMG-CoA reductasa inactiva puede ser también llevada a cabo mediante incubación con una preparación de fosfoprotein fosfatasa hepática parcialmente purificada (151). Recientemente Beg y col. han demostrado que la inactivación de la reductasa hepática en presencia de ATP -Mg²⁺ está acompañada de una incorporación de ³²P por ³²P-ATP en la proteína microsomal que puede precipitarse con anticuerpo de la HMG-CoA reductasa (152). Resultados semejantes fueron obtenidos por Bové y Hegarolt (153) y por Keith y col (154).

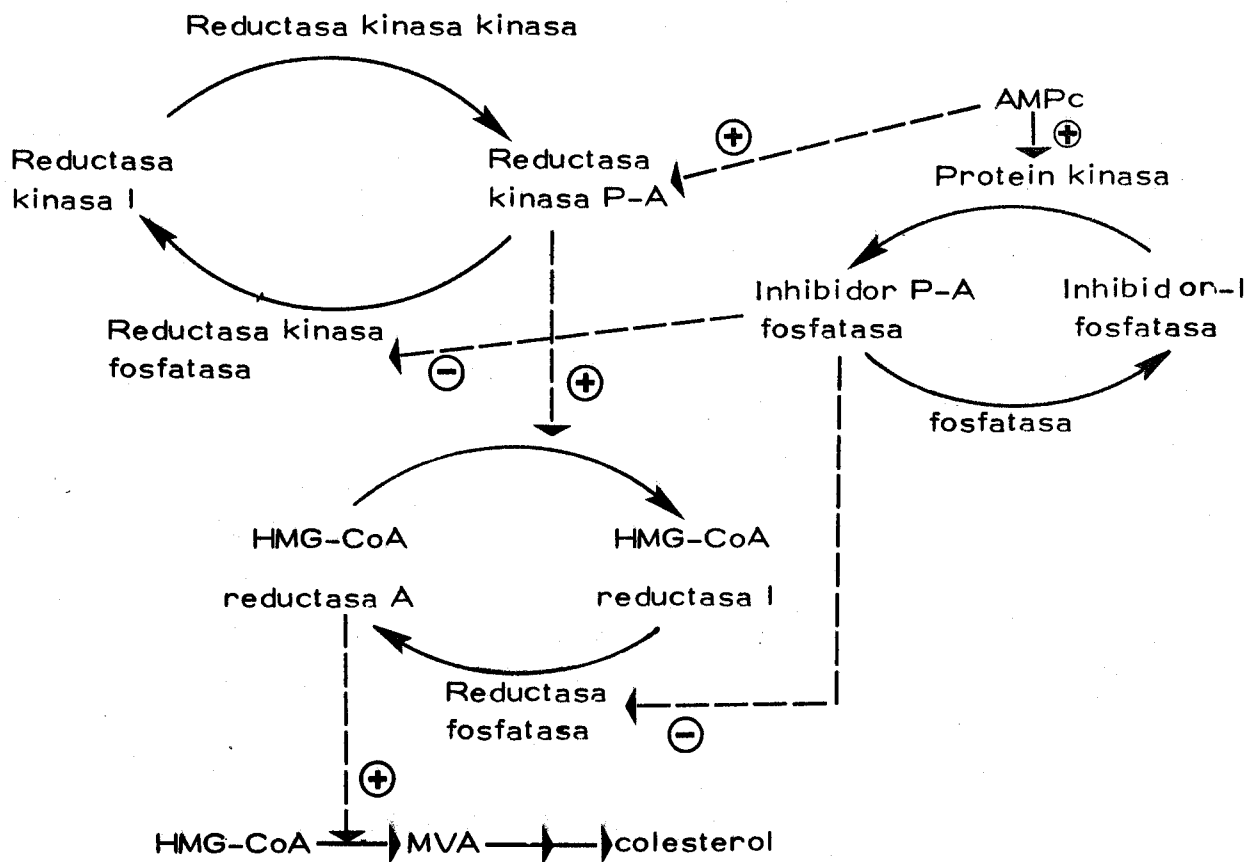
En el curso de sus estudios, Nordstrom y col. han visto que la activación de la HMG-CoA reductasa parece ocurrir durante el aislamiento de los microsomas con las técnicas normales utilizadas en la mayoría de los laboratorios (150). Estos investigadores mostraron que si la homogenización del tejido y aislamiento de los microsomas se llevaba a cabo en presencia de FNa, la actividad del HMG-CoA reductasa microsomal resultante era solamente 1/7 de la cantidad que se obtenía cuando los microsomas eran aislados en ausencia de flúor. Estas investigaciones sugirieron que en condiciones normales el 85 % de la HMG-CoA reductasa de hígado de rata estaba en forma

fosforilada (inactiva) y que la enzima comenzaba a activarse artificialmente durante el aislamiento de los microsomas (150). En otros trabajos muy recientes, se ha observado que la forma inactiva de la reductasa gradualmente desaparece con el tiempo en cultivos de hepatocitos de rata. Después de 48 horas de cultivo la HMG-CoA reductasa llega a activarse de forma espontánea alcanzando un 100 % a las 72 horas (155).

Asímismo, ya en 1980, Gil y col. (156) han purificado parcialmente una HMG-CoA reductasa fosfatasa que libera ³²P a partir de la HMG-CoA reductasa marcada con este isótopo, lo cual lleva consigo la restauración de la actividad reductasa. De esta manera parece quedar definitivamente establecido que la reductasa puede sufrir "in vitro" un ciclo de fosforilación desfosforilación cuyo papel fisiológico "in vivo" permanece aún por esclarecer.

De cualquier forma, los estudios anteriores plantean la cuestión de si los factores fisiológicos conocidos que regulan la HMG-CoA reductasa en hígado de rata, operan predominantemente mediante cambios de la cantidad de proteína enzimática o cambiando el estado de fosforilación de la enzima.

Beg, en su último trabajo, muestra el siguiente esquema de la fosforilación y desfosforilación de la reductasa con las enzimas que están implicadas en este mecanismo (157).



Representación esquemática de la modulación de la actividad enzimática de la reductasa kinasa y HMG-CoA reductasa de hígado. La forma activa, inactiva y fosforilada de las enzimas esta designada como A, I, y P respectivamente.

1. E. 2.- Efecto del colesterol de la dieta.

1. E. 2. 1.- Efecto directo sobre la enzima

Como ya hemos expuesto anteriormente, la enzima HMG-CoA reductasa puede estar regulada mediante un control "feed-back" por el propio colesterol (108, 122, 158, 159) producto final de la secuencia metabólica y cuya influencia se suele poner de manifiesto sometiendo a los animales a una sobrecarga de colesterol en la dieta.

Estudiando este efecto del colesterol Higgins y col. encontraron que la inhibición de la actividad específica de la reductasa por dieta de colesterol era un proceso un tanto complejo. Observaron que a las 6 h que siguen a esta alimentación, la actividad reductasa era relativamente baja comparada con la cantidad de proteína enzimática detectada por métodos inmunológicos. Sin embargo después de 12 horas, la cantidad de proteína enzimática y la actividad reductasa quedaban reducidas por igual. Estos datos sugirieron que la alimentación con colesterol disminuía la actividad HMG-CoA reductasa según dos mecanismos: por una parte, una inactivación inmediata y por otra, una reducción de la síntesis de la enzima a más largo plazo (112, 160). Los mecanismos por los que el colesterol regula la actividad reductasa de forma inmediata no se conocen exactamente, considerándose improbable una inhibición alostérica de la reductasa (118).

En lo que se refiere a la regulación de la síntesis de proteína reductasa por efecto del colesterol, se ha visto que puede estar relacionada con la interacción del colesterol a la cromatina (161). En efecto, se ha observado que el colesterol libre y esterificado se asocia rápidamente con la cromatina en la fracción proteica ácida del ADN en hígado de rata. La alimentación de colesterol, incrementa el colesterol ligado a la cromatina y

decrece la relación colesterol / colesterol esterificado asociados a cromatina. Esta relación también cambia durante el ciclo diurno de biosíntesis de colesterol, de forma que se aproxima a la unidad durante el cénit de actividad reductasa y se incrementa 3.5-5 veces cuando la actividad comienza a declinar. El control por colesterol en la transcripción del código genético para la reductasa u otras moléculas reguladoras es una posibilidad interesante (118).

El hecho de que la presencia o ausencia de colesterol esterificado favoreciera más o menos la inhibición de la reductasa hizo estudiar más detenidamente el efecto de las dos formas posibles de presentarse el colesterol (libre y esterificado).

Según Harry y col. (162) la supresión de la actividad reductasa por dieta de colesterol está acompañada de un incremento en el contenido de colesterol en hígado, incrementándose principalmente los niveles de ésteres de colesterol. Este colesterol esterificado también aumenta en las membranas microsomales y la adición de colesterol-éster a un medio de cultivo de células de hepatomas tisulares, suprime la actividad reductasa de una forma más efectiva que el propio colesterol. Ahora bien, cuando se alimenta con colesterol a ratas con hepatomas, estos acumulan menos colesterol esterificado que los hígados normales y la actividad reductasa es inhibida solo parcialmente. La pérdida del control "feed-back" por dieta de colesterol en la síntesis de colesterol hepático, corresponde a un defecto, metabólico característico de un hepatoma desarrollado (163, 164).

En cultivos de fibroblastos humanos, la adición de lipoproteínas (LDL) reprime la actividad reductasa y también incrementa los niveles de colesterol esterificado. El incremento en el contenido de estos ésteres

en fibroblastos, esta relacionado con un incremento en la actividad de la enzima colesterol-acil-transferasa. Por el contrario, en fibroblastos de pacientes de familias con hipercolesterolemia homocigótica, la actividad reductasa no se reprime ni con lipoproteínas LDL ni con colesterol esterificado.

En general se sugiere que el nivel de colesterol esterificado puede estar inversamente relacionado con la actividad HMG-CoA reductasa. Sin embargo esto no ocurre bajo todas las condiciones fisiológicas como puede ser el desarrollo de ratas jóvenes (118).

En la mucosa intestinal, por observaciones indirectas, se indica que la actividad reductasa disminuye por dieta de colesterol y por ayuno, pero de forma menos pronunciada que la enzima hepática, siendo la inhibición de un 30 % en la mucosa intestinal (165).

En el caso del pollo el sistema "feed-back" del colesterol se activa rápidamente por el colesterol exógeno (166).

1. E. 2. 2. - Efecto sobre la membrana microsomal

Aunque se acepta que el colesterol regula la HMG-CoA reductasa a través de un mecanismo que afecta a la velocidad de síntesis ó degradación de la enzima, y puesto que la vida media de la degradación de la enzima está comprendida entre 2-4 horas en ratas (139-140), el descenso en la actividad reductasa (10 % de la actividad de los animales controles) observado después del tratamiento no puede ser debido a cambios en la velocidad de síntesis de la enzima. Parece más probable que lo que ocurra sea un cambio en la concentración de colesterol en la membrana, en las proximidades del

lugar en que se localiza la HMG-CoA reductasa. Este cambio, produciría una modificación inmediata en la actividad de la enzima que puede ser seguida de cambios en la concentración de la misma.

Las membranas biológicas contienen en general cantidades variables de colesterol. Se ha demostrado que las moléculas de colesterol son componentes móviles que ocupan huecos del interior hidrocarbonado de las membranas, estabilizando así la estructura de la bicapa lipídica (167). Así pues las moléculas de colesterol localizadas principalmente entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos restringen la movilidad de las mismas. Esto, puede producir interferencia en la interacción de proteínas hidrofóbicas y fosfolípidos y puede también cambiar la permeabilidad de la membrana (168). Varios autores (168, 169), consideran que la fluidez de las membranas biológicas puede estar correlacionada con los componentes químicos ó moleculares de la célula; especialmente con el contenido en colesterol ó relación colesterol/fosfolípidos. Sugieren, que el colesterol es un importante factor en el control de la fluidez de las membranas celulares. Kutchai, H. y col. (170) comprueban que los cambios en la composición en ácidos grasos y relación molar colesterol/ fosfolípidos que ocurre durante el desarrollo, en membranas plasmáticas (mitocondriales, y de retículo endoplásmico) de corazón de pollo son paralelos a los cambios en la microviscosidad durante el desarrollo. En las últimas etapas de embriogénesis y durante el desarrollo post-natal Boland y col.(171) han encontrado cambios en la cantidad de ácidos grasos saturados y colesterol en microsomas de músculo esquelético de pollo que son similares a los encontrados en corazón.

Teniendo en cuenta el importante papel que puede jugar el colesterol sobre la fluidez de la membrana, varios autores (172) han estudiado el efecto de la supresión del colesterol de membranas de eritrocitos

humanos, por incubación con liposomas de fosfatidilcolina. Los resultados muestran que las actividades enzimáticas de tres enzimas (quinasa) ligadas a membranas son afectadas por la falta de colesterol. Puesto que las alteraciones artificiales del contenido en colesterol de las membranas eran comparables a las observadas "in vivo" en varias condiciones patológicas, sugieren que los cambios observados puedan ser debidos a mecanismos por los que los lípidos de la membrana influyen sobre las actividades enzimáticas "in vivo". Otro grupo de trabajos (169) orientados también hacia un mejor conocimiento de los efectos del colesterol y sus ésteres sobre la fluidez de las membranas, estudian la incorporación "in vitro" de ambos a membranas citoplásmicas que fueron incubadas con estos compuesto marcados isotópicamente. Sus resultados demuestran que el oleato de colesterol es incorporado "in vitro" a la membrana celular de eritrocitos incrementando su rigidez. El efecto del colesterol libre fue similar (173, 174, 175, 176, 177, 178) pero fue más efectivo el éster, de manera que los datos parecen indicar que los ésteres de colesterol hacen la membrana celular más rígida, más firme y menos fluída que el colesterol libre. Este estado de mayor rigidez de la membrana puede que sea más estable que el que se origina al incorporarse colesterol libre porque los ésteres de colesterol pueden ser extraídos de la membrana solamente por hidrólisis con enzimas lisosomales (179), mientras que el colesterol libre puede ser fácilmente descargado.

Así pues los ésteres del colesterol parecen tener a nivel de membrana una importante actividad biológica. Mayor interés presentan los trabajos realizados "in vivo" en animales que han sido sometidos a suplementación de colesterol en la dieta. Medidas de fluorescencia (180) muestran que ratas suplementadas con una dieta de colesterol al 4 % durante un mes presentan modificaciones en la estructura y función de sus microsomas hepáticos. Sabine y col. (212) muestran mediante representaciones de Arrhenius

que la HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado de rata duplica su energía de activación tras la suplementación de colesterol y piensan que este puede ser el motivo de la inhibición de su actividad. Estudios similares (181) fueron llevados a cabo sobre otras enzimas microsomales diferentes de la reductasa, para determinar si el efecto de una dieta rica en colesterol era específica de esta enzima. Los resultados indicaron que mientras se inhibía la actividad reductasa se incrementaban la γ - α - hidroxilasa. Sin embargo las actividades de la acilCoA: colesterol acil transferasa y otras enzimas microsomales no implicadas directamente en el metabolismo del colesterol (por ejemplo, la glucosa-6-P fosfatasa) no eran afectadas. Es también significativo que el colesterol de la dieta no alteró la energía de activación de otras enzimas más que la de la reductasa. Las otras enzimas no son sensibles a la variación de la fluidez de la membrana inducida por el colesterol de la dieta por lo que este mecanismo de regulación "feedback" por la dieta puede ser específico para la HMG-CoA reductasa.

Meller y col (182) sustituyen el colesterol por un análogo fotosensible, de propiedades semejantes a las del colesterol, que se incorpora a las membranas celulares y también se esterifica intracelularmente. Ya a las 4 horas de ser administrado intravenosamente a ratas se encuentra ampliamente distribuido en todas las fracciones subcelulares (8 % del colesterol microsomal y menos del 3 % en forma de ésteres) Al mismo tiempo, hay pérdida de actividad reductasa y un incremento, al doble, de la acilCoA: colesterol acil transferasa, encontrada de lo que opinan Sipat y col. (181). Así pues ambas actividades estarían recíprocamente coordinadas. Descartan la posible influencia de los ésteres del colesterol (en contra de otros autores) en la regulación de la reductasa dada la casi despreciable concentración de ésteres existente en sus condiciones experimentales.

Por último, estudios muy recientes (183) sobre regulación de la HMG-CoA reductasa en cultivos de células C-6-gliales indican que la actividad de esta enzima microsomal se inhibe por modificación de la composición en fosfolípidos de la membrana. La posibilidad de que la actividad catalítica de la reductasa sea directamente dependiente de fosfolípidos se sugiere por el hecho de que la reductasa purificada tenga lípidos asociados (116).

1. E. 3.- Otros factores que influyen sobre la HMG-CoA reductasa

Además de la inhibición "feed-back" de la reductasa llevada a cabo por el colesterol, existen numerosas pruebas de la que la enzima se ve afectada por otras sustancias, más o menos relacionadas con el propio colesterol. En este aspecto debemos destacar que el efecto del colesterol usado habitualmente en experimentación es superior al del colesterol altamente purificado, habiéndose observado la acumulación de derivados oxigenados del mismo cuando el producto se mantiene cierto tiempo al aire (134). La mayor acción inhibitoria de los derivados oxigenados del colesterol sobre la reductasa está apuntada por numerosos autores (118, 184). Muchos esteroides suministrados al ratón ó añadidos a un medio de cultivo de células suprimen la actividad reductasa al menos con la misma efectividad que lo hace el propio colesterol. En este sentido, se ha postulado que las lipoproteínas y el colesterol producen una disminución de la actividad reductasa en virtud de una espontánea oxidación del colesterol (118).

Brow y Goldstein (185) concluyen que se requiere la presencia de un oxígeno en posición 3 del núcleo esteroide para regular la actividad reductasa.

También existen dos potentes inhibidores de la reductasa que corresponden a intermediarios del catabolismo del colesterol y son el 7α -hidroxicolesterol, primer intermediario en la producción hepática de ácidos biliares, y el 20α -hidroxicolesterol y, primer intermediario en la producción de hormonas esteroídicas (118, 158). Así pues la regulación de la síntesis de colesterol en diferentes órganos puede variar dependiendo de los productos finales eliminados, como son los ácidos biliares en intestino y las hormonas esteroídicas en las glándulas endocrinas.

Estudiando el efecto que produce una dieta de proteínas, se ha observado pequeños cambios en el colesterol plasmático tanto en pollo como en hombre, mientras que en conejo los cambios son muy significativos. Por otra parte, en hombre, conejo y pollo, durante el ayuno se eleva el colesterol plasmático (95).

Se ha demostrado que las lipoproteínas juegan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de colesterol. Así muchos autores indican que las lipoproteínas LDL o VLDL ricas en colesterol reprimen la actividad reductasa (119, 126, 185, 186). Sin embargo las lipoproteínas HDL unidas a colesterol son menos efectivas en esta inhibición (185).

Parece ser que los mecanismos de acción de estos complejos de lipoproteínas están relacionadas con la afinidad a receptores de membrana que modificarían la HMG-CoA reductasa. No obstante estos mecanismos no se conocen con seguridad (185, 187).

En lo que se refiere al papel de la bilis, en rata se ha visto que presenta una proteína que inhibe la capacidad hepática para formar colesterol a partir de acetato pero no de mevalonato (118). El efecto de esta proteína sobre la HMG-CoA reductasa hepática está demostrado por observaciones

de McNamora y Rodwell (109). También se ha detectado una proteína inhibidora de la reductasa en bilis bovina por estos mismos autores. En ningún caso se conoce el mecanismo de esta inhibición.

En general, aunque es un tema polémico, parece ser que los ácidos biliares no regulan la reductasa hepática pero sí la colesterogénesis intestinal. observándose que la favorecen (188). La entrada de colesterol en las células del intestino se facilita por los ácidos biliares y por consiguiente, ambos juegan un papel en la regulación de la HMG-CoA reductasa intestinal, no obstante una correlación directa entre la cantidad de colesterol o ácido biliar y la alteración en la actividad HMG-CoA reductasa no ha sido observada "in vitro" (189).

Existen muchos más inhibidores o activadores de la HMG-CoA reductasa que se han descrito pero en general no se conoce su mecanismo de acción (118).

Del efecto de las hormonas sobre la actividad reductasa hepática se conoce muy poco (200). Un resumen del mismo se expone a continuación.

Entre las hormonas pancreáticas se ha observado que después de inyectar insulina a ratas normales se elevan tanto la actividad reductasa como la síntesis de colesterol (190).

La actividad es máxima después de dos horas, decreciendo a los niveles del pretratamiento a las 6 horas.

En ratas diabéticas la actividad reductasa es muy baja sin embargo, la inyección de insulina produce una actividad reductasa máxima

comparable a la de animales normales (190). Se ha observado que la estimulación de reductasa por medio de insulina se bloquea parcialmente por glucagon (191).

El efecto que la insulina tiene sobre el ritmo en ratas diabéticas se interpreta según los resultados de algunos investigadores (192) como que la insulina promueve la síntesis de proteína reductasa. Otros autores (193) indican que la insulina no se requiere para los cambios de actividad reductasa inducida por la dieta.

El glucagon actuaría como un antagonista de la acción de la insulina y la triyodotironina (190). En ratas normales una inyección de glucagon 6-16 horas antes del máximo diurno, inhibe este aumento diurno (191, 192, 194). Al parecer el glucagón actúa limitando el incremento de actividad reductasa iniciado por otras hormonas.

Entre las hormonas del tiroides, la triyodotironina estimula la actividad reductasa, siendo necesarias 30 horas para que se noten sus efectos. Esta alcanza entonces un nivel ligeramente superior al normal que persiste al menos unas 32 horas más (195). Ness y col. (196) sugieren que la estimulación de la actividad reductasa por triyodotironina puede estar limitada por un elemento de control negativo, posiblemente hidrocortisona o glucagón

En el caso de hormonas adrenales, la utilización de ratas adrenalectomizadas para establecer el papel fisiológico de estas hormonas sobre la actividad reductasa proporciona datos conflictivos. La adrenalectomía parece elevar arrítmicamente la incorporación de acetato a colesterol (197), causar descenso arrítmico de la actividad reductasa (198) y no tener efecto sobre el nivel de actividad reductasa ni sobre su ritmo. A pesar de estas

contradicciones, resumimos los efectos de las hormonas adrenales (118).

A lo largo del día varía el nivel plasmático de corticosterona, con un ritmo cuyo pico aparece 6 horas antes que el de la reductasa. Hickman y col. (197) han sugerido que la corticosterona podría actuar como un regulador negativo de la síntesis de colesterol. No obstante la iluminación continua elimina el ritmo de la corticosterona plasmática pero no el de la reductasa (118).

El aumento de la actividad reductasa por T_3 en ratas hipofisectomizadas, puede inhibirse mediante una inyección posterior de hidrocortisona (191). En ratas diabéticas una inyección previa de hidrocortisona inhibe el 85 % del aumento de actividad que sigue normalmente a una inyección de insulina (191) e inhibe además el 90 % del incremento diurno (192). A pesar de ello, el aumento de la actividad reductasa en ratas normales causado por adrenalina no se suprime por inyección simultánea de hidrocortisona.

La adrenalina aumenta la actividad reductasa en ratas normales, pero no en ratas adrenalectomizadas o hipofisectomizadas. (198).

Cuando se inyecta noradrenalina a ratas normales, la incorporación de acetato a colesterol se duplica en 12 horas (199). El mismo tiempo después de una inyección de noradrenalina a ratas adrenalectomizadas la actividad reductasa hepática aumenta un 30 % (198). En trabajos recientes se ha observado que la noradrenalina inhibe la secreción de colesterol y lipoproteínas, aumentando la actividad reductasa.

En lo que se refiere a las hormonas sexuales, los estrógenos, la progesterona y los andrógenos pueden suprimir la actividad reductasa cuando se añaden a un medio de cultivo de fibroblastos humanos (201) o bien cuando

son ingeridas o inyectadas en ratas y mono (202, 203). Sin embargo no está claro si estas hormonas actúan como tales o como análogas del colesterol.

En resumen aunque son necesarios mas datos para emitir un modelo fidedigno del papel de las hormonas en la regulación de la actividad reductasa, la evidencia presente sugiere que las hormonas llevan a cabo esquemáticamente, tres tipos de operaciones básicas:

1.- Elementos de control positivo: factores que originan un incremento en la síntesis y /o la actividad catalítica de la reductasa (insulina y posiblemente las hormonas tiroideas).

2.- Elementos permisivos: factores que deben estar presentes para que la síntesis y / o la activación tengan lugar (hormonas tiroideas , y posiblemente insulina).

3.- Elementos de control negativo: factores que impiden un incremento, o bien originan una disminución de la síntesis y / o expresión de la actividad (hidrocortisona, y glucagón).

En la actualidad la información que hay es insuficiente para decidir entre uno u otro patrón de interacción de entre estas tres clases de efectos que explique adecuadamente la regulación de la reductasa(118).

II PLAN DE TRABAJO

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

- 1.- Puesta a punto de la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa de diferentes órganos de pollo recién nacido. En este apartado se incluyen todos los condicionamientos para el asilamiento de la reacción enzimática por métodos radioisotópicos.
- 2.- Estudio de la evolución de la actividad HMG-CoA reductasa de hígado, cerebro y asa duodenal a lo largo del desarrollo postnatal del pollo.
- 3.- Establecimiento de la influencia que el colesterol suplementado a la dieta puede tener sobre la actividad reductasa en los órganos y edades antes mencionados.
- 4.- Estudio de la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables por cortes o fragmentos de los órganos anteriormente citados. Influencia del colesterol sobre dicha incorporación.
- 5.- Estudio de la composición lipídica microsomal a lo largo de la edad en hígado, cerebro y asa duodenal de pollo. Influencia del colesterol sobre dicha composición.

- 6.- Establecimiento de las variaciones de la relación molar colesterol / fósforo lipídico como un índice de la fluidez de las membranas y su relación con la HMG-CoA reductasa.

III PARTE EXPERIMENTAL

3. A. 1. - Material biológico

Se utilizaron pollos machos, Gallus domesticus, raza Leghorn Blanca (denominación comercial: Shaver Star Cross - 288), suministrados por Avigrana S.A. El personal especializado de la referida entidad determinó el sexo de los animales recién nacidos.

Las experiencias se realizaron en pollos con edades comprendidas entre 0 y 16 días.

3. A. 2. - Acondicionamiento de los animales.

Desde el día del nacimiento los animales se colocaron en jaulas dotadas de bebedores automáticos y comederos suficientemente amplios que permitían una alimentación "ad libitum" de los pollos. En condiciones normales, se utilizó una dieta estandar para "Pollitos Arranque" (Sanders A-00).

La habitación, sin ventanas, se iluminaba mediante 8 tubos fluorescentes de 20 wátios cada uno, situados frente a las jaulas. La iluminación a que eran sometidos los animales presentaba un periodo de luz de 12 horas, temporizado automáticamente. Para mayor comodidad este ciclo diurno artificial se hizo coincidir aproximadamente con el natural corrigiéndose según el horario oficial.

La ventilación se conseguía mediante un extractor automatizado.

3. A. 3. - Productos

Todos los compuestos radiactivos que se utilizaron fueron suministrados por Radiochemical Centre (Amersham).

Como sustrato de la reacción enzimática se utilizó 3-Hidroxi-3 metil- 3-¹⁴C glutaril - Coenzima A, y como estandar interno DL-2-³H mevalonolactona. Para cuantificar la recuperación en la cromatografía, se requirió asimismo ácido DL-2-¹⁴C mevalónico.

En el caso de la incorporación de acetato, se lleva a cabo con 1-¹⁴C -acetato sódico, utilizándose como estandar interno 7(n) - ³H colesterol.

En lo que se refiere a productos no marcados, se han utilizado HMGCoA, G6P, EDTA y DTT de la casa Sigma Chemical Co. (USA).

La enzima G6PDH (grado I) y el coenzima NADP fueron suministrados por la casa Boehringer (Mannheim). Mientras no se especifique lo contrario los restantes productos utilizados procedían de la casa Merck (Darmstadt) y Carlo-Erba (Milan).

3. A. 4. - Aparatos

Centrifugación. - Para la preparación de suspensiones microsomales, se utilizó una centrifuga refrigerada Beckman j-21B y para la obtención final de microsomas una ultracentrífuga preparativa Beckman L3-50.

La sedimentación de proteínas necesaria tras la reacción enzimática se realizó en una microfuga tipo B, Beckman.

Las centrifugaciones realizadas a bajas revoluciones se hicieron en un sistema refrigerado MSE, modelo Mistral 6L

Espectrometría. - Las determinaciones colorimétricas se realizaron en un fotocolorímetro Bausch-Lomb modelo Spectronic-20. Las determinaciones isotópicas de ^{14}C y ^3H se llevaron a cabo en un equipo de centelleo líquido Philips Mod-PW 5410.

Termostatación y gaseo. - Durante la reacción enzimática la temperatura se mantuvo constante mediante termostatos tipo "fuerabordas" Tecam Tempunit (precisión = $\pm 0.1^\circ\text{C}$).

Las incubaciones de los cortes de tejidos para el estudio de la incorporación de acetato se realizaron en aparatos Gallenkamp IH-350, dotados de sistemas de agitación.

En la determinación de fosfolípidos, las digestiones se llevaron a cabo en un baño de arena Investar.

Todos los gases utilizados fueron de gran pureza y suministrados por Oximesa S. A.

Aparatos de medida auxiliar. - Las pesadas de los reactivos se realizaron en una balanza Mettler H20T (P max = 160 g; d = 0.01 mg). Para pesadas no tan finas se utilizó una balanza Sartorius (P max = 160 g; d = 0.1 g).

Los pequeños volúmenes utilizados en diversas técnicas se midieron con micropipetas "Emil-Works" de enrasado automático por estrangulamiento (autocero High precision).

Para determinar el pH se empleó un aparato Beckman Expandomatic SS-2 ($\text{pH} \pm 0.005$).

Otros. - El tejido biológico se homogenizó en un "Potter" mecánico (MSE) con pistilo de vidrio.

Los cortes de tejido se realizaron con un microtomo: manual C.A. Thomas Co. Filadelfia y cuchillas nº 7 120 D.

Para la reacción enzimática se utilizaron tubos de polietileno Beckman de 400 μl , desechables y con cierre hermético.

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Whirlimixer de la firma Fisous Scientific Apparatus Limited.

Los lípidos insaponificables disueltos en éter de petróleo se llevaron a sequedad en un Rotavapor "R" de la firma Büchi.

Los datos experimentales se procesaron en una Programadora Olivetti P-101.

3.B.1. - Aislamiento de microsomas

En el trabajo que hemos realizado, se ha estudiado entre otras cosas, la actividad del enzima HMGC_oA-Reductasa de la que se sabe por numerosas experiencias (118) que se trata de un enzima ligado a membranas y más exactamente a aquellas que corresponde a la fracción microsomal. Por todo esto, previo a la determinación de la actividad, es necesario aislar por centrifugación diferencial estas membranas denominadas usualmente "membranas microsomales" que corresponden a fragmentos del retículo endoplasmático liso y rugoso, ribosomas, y aparato de Golgi.

Se ha seguido el procedimiento descrito por Dugan y col. (141) con ligeras modificaciones.

Los animales se mataron por decapitación, extrayendoseles el cerebro, hígado y zona intestinal correspondiente al asa duodenal. En el caso del hígado hay que tener cuidado de que no se arrastre consigo ni se rompa la vesícula biliar.

Una vez secos y pesados los organos, se trocearon y se colocaron en tubos de homogenización con un tampón fosfato potásico 50 mM pH = 7.4 que contenía además una serie de protectores (EDTA 30 mM, CINa 250 mM y DTT 1 mM) en una proporción peso tejido / vol. tampón 1/3. La preparación del tampón requiere una serie de consideraciones debido a que el EDTA basicifica considerablemente el medio. Por ello, se disuelven los protectores EDTA, CINa y DTT en un volumen pequeño de

$\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$ 50 mM hasta conseguir un pH = 7.4 enrasando luego con tampón fosfato pH = 7.4 50 mM hasta un volumen adecuado.

Los tubos se mantuvieron durante este proceso y los siguientes, en un baño agua-hielo con idea de evitar que las modificaciones térmicas ambientales introdujeran variaciones no controladas de actividad. Seguidamente se homogeneizaron los tejidos en un potter mecánico.

Los extractos obtenidos por homogeneización, se sometieron a una primera centrifugación a $5.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C de la que se desechó el sedimento (núcleos, células enteras, restos celulares gruesos etc.) y el sobrenadante fué sometido a una nueva centrifugación a $15.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Igualmente se desechó el sedimento (mitocondrias, lisosomas y microcuerpos) tomándose el nuevo sobrenadante y centrifugándolo por última vez a $105.000 \times g$ durante 60 minutos a 4°C . El sobrenadante obtenido se desechó y se tomó el sedimento que corresponde a la fracción microsomal, resuspendiéndose en 1 ml del mismo tampón utilizando durante la extracción. Estas suspensiones microsomales se guardaron a 4°C hasta el momento de la reacción.

La determinación proteica de las suspensiones microsomales se realizó siguiendo el método de Lowry y col. (204) basado en la asociación de las reacciones de Biuret y de Folin, la primera característica de los enlaces peptídicos y la segunda del grupo fenólico de los restos de tirosina.

3.B.2. - Determinación de la actividad HMGCoA-Reductasa

Se ha utilizado el método radiactivo desarrollado por Shapiro y Rodwell (135) con muy pequeñas modificaciones.

3.B.2.1. - Fundamento

En esta técnica se mide la incorporación de radiactividad del sustrato marcado (^{14}C - HMG-CoA) al producto de la reacción (Mevalonato). Normalmente se incluye un estándar interno de marcado distinto (^3H - mevalonato) con idea de corregir las pérdidas durante el aislamiento ulterior del producto formado.

Debido al aporte considerable de coenzima reducido que se requiere en la reacción (2 moléculas de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ por molécula de sustrato transformado), frecuentemente se recurre a un sistema enzimático acoplado, que regenera los equivalentes de reducción gastados, a un ritmo adecuado. El sistema regenerante utilizado en nuestro caso está integrado por Glucosa-6-P, glucosa-6-P-deshidrogenasa y NADP^+ de tal manera que el coenzima oxidado durante la conversión de HMG-CoA en mevalonato es reducido de nuevo mediante la siguiente reacción.



Una vez transcurrida la reacción, las mezclas son acidificadas con un doble objeto: inactivar la reductasa y convertir el ácido mevalónico en su δ -lactona, la cual presenta una polaridad sensiblemente menor que la del sustrato (HMG-CoA) y sus hidrolizados, pudiéndose entonces separar por una técnica cromatográfica el producto y el sustrato de la reacción. Posteriormente los ^3H - mevalono lactona y ^{14}C - mevalonolactona pueden cuantificarse por separado mediante espectroscopia de centelleo líquido.

3. B. 2. 2. - Soluciones utilizadas

Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.4, conteniendo EDTA 30 mM, ClNa 250 mM, y DTT 1 mM.

Sistema regenerante: se preparó extemporáneamente y de manera que en 25 μ l hubiera 4.5 umoles de G6P, 0.3 u. i. de G6P-DH y 450 nmoles de NADP⁺ disueltos en el tampón fosfato anteriormente citado.

Disolución del sustrato: se preparó de tal forma que en 25 μ l existieran las proporciones adecuadas de sustrato marcado y no marcado y una concentración de 50 nmoles. La radiactividad específica del sustrato marcado estaba comprendida entre 1000 y 5550 dpm/nmol. Como disolvente se utilizó tampón fosfato potásico 50 mM pH = 5.8 la disolución se conservó congelada a -20°C.

Solución de mevalonolactona: se preparó una solución tampónada de mevalonolactona y ³H -mevalonolactona tal que en 25 μ l hubiera 0.78 mg de lactona y entre 40.000 - 160.000 dpm de ³H-lactona, la mevalonolactona y la ³H mevalonolactona se conservaron en soluciones bencénicas o toluénicas a -20°C. Para su utilización, se evaporaron extemporáneamente volúmenes adecuados bajo corriente de N₂ y se resuspendieron en el tampon de extracción.

3. B. 2. 3. - Reacción enzimática

La mezcla de reacción contiene un volumen total de 150 μ l siendo el procedimiento general seguido el que vamos a ver.

100 μ l de una suspensión microsomal con un contenido protéico de 2-4 mg/ml, se añadió a los tubos de reacción (tubos desechables de 400 μ l con tapón), y se preincubaron estos a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente se inició la reacción por adición de 25 μ l de solución de HMG-CoA marcado (sustrato) y 25 μ l de sistema regenerante, cerrándose los tubos y tras una ligera agitación se incubaron 30 minutos a 37°C.

Pasado el tiempo, se detuvo la reacción con 25 μ l de ClH 10 N, añadiéndole también 25 μ l de solución de 3 H mevalonolactona. Los tubos cuyo volumen ahora era de 200 μ l se mantuvieron otros 30 minutos a 37°C para facilitar la completa lactonización del mevalonato formado durante la reacción. Por último, se centrifugaron los tubos durante 1 minuto a 1000 x g en una microfuga, con el fin de sedimentar las proteínas y se conservaron luego en frío hasta el momento de la cromatografía en capa fina.

3. B. 2. 4. - Aislamiento y medida del producto de la reacción

Como ya hemos indicado, el producto de la reacción, debido a su distinta polaridad con el sustrato puede separarse fácilmente por cromatografía. Nosotros hemos seguido una técnica cromatográfica en capa fina.

Para ello, se prepararon las placas de la forma siguiente: sobre un extensor Shandon Unoplan se colocaron placas de vidrio de 5 x 20 cm y se desengrasaron con acetona. Por otro lado se pesaron 50g de silicagel G tipo 60 y se le añadieron 100 ml de agua destilada. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1.5 - 1.5 minutos (según la persona) y se vertió la suspensión en un dispositivo distribuidor, ajustado para dar un espesor de placa de aproximadamente 0.4 mm, extendiéndose el contenido uniformemente sobre las placas. Estas se dejaron enfriar al aire completamente y se colocaron

en una gradilla especial colocandose en una estufa a 110°C durante una hora como minimo para su activación.

Sobre estas placas activadas, y a unos 2 cm del borde inferior de la placa, se aplicaron 100 µl de cada uno de los tubos de reacción. Una vez secas las muestras, se introdujeron en cubetas de cromatografía donde previamente se habia añadido una mezcla de benceno-acetona (1:1), permaneciendo la cubeta cerrada con anterioridad al menos 1 hora para conseguir una perfecta saturación. Las placas se desarrollaron casi hasta el extremo superior de las mismas, sacándose y dejandolas secar.

Para visualizar las sustancias en las placas, se puede revelar con iodo, pero en nuestro caso esto tenia un inconveniente y era que el iodo no se eliminaba de una forma total de la placa a pesar de parecerlo externamente apareciendo un poco de color en el vial de centelleo lo que daba lugar a un descenso en la eficiencia de contaje. Por todo ello, durante la puesta a punto de la técnica se determinó el Rf correspondiente a la MVA-lactona (0.38 - 0.70) raspándose esta zona sistemáticamente y colocándola en los viales de centelleo a los que se le añadió 10 ml de líquido de centelleo (7 g de PPO, 0.3 g de dimetil-POPOP y 100 g de Naftaleno en un litro de Dioxano). Se agitaron durante 15 segundos y se llevaron a medir en un contador de centelleo líquido.

En cada experiencia junto con los viales problema se prepararon dos viales conteniendo 20 µl de solución ^3H -MVA-Lactona y una cantidad de ^{14}C -MVA con una radiactividad de 3-6 veces menor, constituyendo estos viales el patron de tritio.

3.B.2.5. - Cálculos

La actividad específica del enzima se calcula en cada caso según la expresión siguiente:

$$Ae = \frac{Dpm \text{ } ^3\text{H p} \times Dpm \text{ } ^{14}\text{C m}}{Dpm \text{ } ^3\text{H m} \times Re \times P \times T} \text{ p moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot.}^{-1}$$

donde

Ae = actividad específica de la HMG-CoA -Reductasa

Dpm $^3\text{H p}$ = desintegraciones por minuto del ^3H medido en el patrón.

Dpm $^3\text{H m}$ = desintegraciones por minuto del ^3H medido en el problema.

Dpm $^{14}\text{C m}$ = desintegraciones por minuto del ^{14}C medido en el problema.

Re = radiactividad específica del HMG-CoA en Dpm / pmol

P = mg de proteína puesta en el tubo de reacción.

T = tiempo en minutos.

Los valores obtenidos (media \pm error estándar de la media) corresponden a 2-3 experiencias con un mínimo de 4 determinaciones cada una, siendo los extractos, mezcla de 5 pollos.

3.B.3. - Incorporación de acetato a lípidos insaponificables

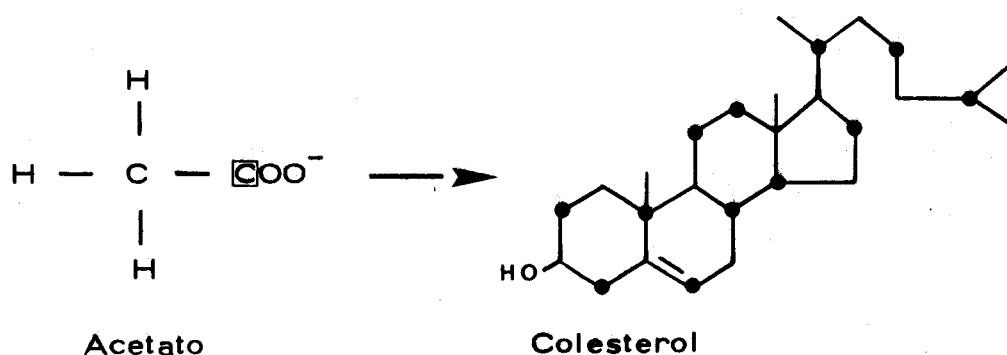
3.B.3.1. - Fundamento

Estudios de K. Bloch, G. Popjak y J. Cornforth sobre biosíntesis de colesterol a partir de acetato, marcado en el grupo metilo o el carboxilo revelaron que ambos átomos de carbono del ácido acético se

incorporaban a colesterol en cantidades aproximadamente iguales; de hecho todos los átomos de carbono del colesterol proceden del acetato.

Teniendo esto presente, hemos trabajado con cortes de tejido incorporando $1-^{14}\text{C}$ -Acetato a lípidos insaponificables entre los que se encuentra el colesterol.

De los estudios antes mencionados se deduce que el $1-^{14}\text{C}$ Acetato da lugar a colesterol marcado de la forma siguiente:



3.B.3.2.- Soluciones utilizadas

a) Tampón Krebs-Ringer bicarbonato pH = 7.4 . - Para su preparación se utilizaron las siguientes disoluciones:

- 120 ml de cloruro sódico 18%
- 96 ml de cloruro potásico 1.15 %
- 18.5 ml de fosfato monopotásico 0.2 M
- 24 ml de sulfato magnésico 3.82 %
- 72 ml de cloruro cálcico 0.11 M
- 72 ml de bicarbonato sódico 1.3 %
- 2280 ml de agua destilada

b) $1-^{14}\text{C}$ - Acetato

La solución de $1-^{14}\text{C}$ -Acetato se preparó a partir de acetato sódico suministrado en forma de polvo liofilizado, disolviendo en agua destilada hasta obtener un preparado con una actividad de $50 \mu\text{Ci/ml}$ que correspondía a una concentración de $0.87 \mu\text{Ci/ml}$. La solución así preparada se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

3.B.3.3. - Obtención e incubación de los cortes

Los órganos se extrajeron del pollo muerto por decapitación y se pusieron en tampon Krebs-bicarbonato frío. Una vez limpios se hicieron los cortes con un microtomo.

Para la incubación se utilizaron matraces cónicos de 25 ml de capacidad con tubuladura lateral.

Los cortes de hígado o porciones de intestino (peso entre 50-100 mg) se colocaron en el matraz junto con 3 ml de Krebs-bicarbonato y $2.5 \mu\text{Ci}$ de acetato.

Las incubaciones se realizaron en un incubador metabólico a 66 oscilaciones / min. durante 1 hora. Durante todo este tiempo los matraces eran gaseados con carbógeno ($95\% \text{O}_2$ y $5\% \text{CO}_2$).

Pasado este periodo se detuvo el proceso añadiendo 20 ml de KOH etanólica al 8% recién preparada y ^3H -colesterol como estandar interno en una cantidad equivalente en dpm. a unas 3-6 veces las d.p.m. esperadas de ^{14}C con objeto de conocer el rendimiento de la extracción de los lípidos insaponificables, corrigiendo de esta manera el defecto cometido en las posibles pérdidas.

3.B.3.4. - Obtención de los lípidos insaponificables

La saponificación de los lípidos se llevó a cabo durante toda la noche. Al día siguiente el contenido del matraz se vertió en un embudo de decantación y se procedió a la extracción de los lípidos insaponificables.

Se lavó el matraz con 20 ml de agua destilada y 25 ml de éter de petróleo (Panreac), que se añadieron al embudo de decantación. Tras agitar vigorosamente y dejar decantar, se recogió la fase superior orgánica, que contenía los lípidos insaponificables. Los que pudieran quedar en la fase acuosa se extrajeron dos veces con 25 ml de éter de petróleo.

Las fases orgánicas reunidas se lavaron tres veces con 20 ml de agua destilada, añadiendo unos ml de una solución saturada de ClNa , que favorece la rápida separación entre las dos fases de los compuestos hidro y liposolubles.

A la fase orgánica resultante, recogida en un matraz Erlenmeyer, se le añadió SO_4Na_2 anhidro (Panreac) como desecante. Después de un mínimo de 30 minutos se eliminó el SO_4Na_2 filtrando a través de un embudo con placa porosa, succionando con una bomba de agua, y recogiendo la fase orgánica sobre un matraz de fondo redondo.

El contenido del matraz se llevó a sequedad en un rotavapor. Seguidamente se redisolvió estos lípidos insaponificables en éter etílico y se trasvasaron a un vial. Se evaporó el éter sobre una superficie a $40\text{ }^\circ\text{C}$, volviendo a redisolverse en 1 ml de cloroformo del cual, en el caso del hígado, se tomaron dos alícuotas de 0.1 ml que se depositaron

en sendos viales, y en el caso del intestino se tomaron 0.5 ml. Estos viales se colocaron sobre una superficie a 60°C para la evaporación del cloroformo y una vez frios se le añadieron 10 ml de líquido de centelleo, compuesto por:

Tolueno : 1
Metanol : 1
PPO : 2 g/l
POPOP . 0.02 g/l.

Los viales se agitaron en un agitador durante 10 segundos midiéndose el contenido en ^{14}C y ^3H en un contador de centelleo líquido, ajustando de forma adecuada los discriminadores de ambos canales (del ^{14}C y del ^3H) y considerando la eficiencia de contaje del ^{14}C y del ^3H de uno y otro canal.

3.B.3.5. - Cálculos.

$$C = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H esperados}}{\text{d.p.m } ^3\text{H medidas } r \times P \times T \times A}$$

C = Concentración de acetato incorporado en nmoles por g^{-1} por h^{-1}

V = volumen utilizado en ml

P = peso de tejido en gramos

T = Tiempo de incubación en horas

A = Actividad específica en dpm/nmol

d.p.m ^{14}C = desintegraciones por minuto medidas debido al ^{14}C

Los valores que se dan corresponden a mezcla de 5 pollos con 4 determinaciones, obteniendo la media \pm S.E.M.

3.B.4.4. - Extracción de lípidos microsomales

Se tomaron dos alícuotas de la suspensión de microsomas con una concentración de proteínas de 1-2 mg/ml, tratándose con ClO_4H 0.6 N para dar una concentración final de 0.3 N y se centrifugó a 0-4°C a 1.000 x g durante 15 minutos. Siguiendo la técnica de Santiago y col. (205), se extrajeron los lípidos del precipitado de la forma siguiente : se añadió a este 1 ml de la mezcla cloroformo:metanol:ácido clorhídrico (200:100:1), removiendo con una varilla de vidrio varias veces durante media hora. A continuación se añadieron 3 ml de ClH 0.1N y se centrifugó a 1.000 x g durante 25 minutos. De las tres fases separadas, la fase acuosa se eliminó succionando con una pipeta Pasteur. El paquete de proteínas, que constituyen la fase intermedia, se separó de la fase clorofórmica por una cuidadosa decantación a un tubo de boca esmerilada donde se guardó a 0°C; mientras que las proteínas de la interfase se sometieron a una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento, y la fase clorofórmica de esta segunda extracción se mezcló con la procedente de la primera llevándose a sequedad bajo corriente de nitrógeno; seguidamente se redisolviéron estos lípidos totales en un volumen adecuado con cloroformo.

3.B.5. - Determinación de colesterol

Para la determinación de colesterol se siguió el método de Carv (206) y Martenson (207).

3.B.5.1. - Fundamento

Se trata de una reacción colorimétrica basada en la reacción de Lieberman-Burchard, donde el colesterol en presencia de ácido sulfúrico

concentrado y anhídrido acético, sufre una deshidratación, condensación e isomerización dando como resultado final la aparición de compuestos coloreados con un máximo de absorción a 625 nm.

3.B.5.2. - Disoluciones utilizadas

Solución patrón de colesterol : 1 mg/ml en cloroformo.

Reactivo A: mezcla extemporánea de anhídrido acético: ácido sulfúrico (10:1) preparada de la forma siguiente: A 80 ml de anhídrido acético previamente enfriado a 4°C, se le agrega lentamente y bajo chorro de agua fría 8 ml de sulfúrico concentrado. Terminada esta operación se homogeniza bien la mezcla, comprobando que esté exenta de todo color.

3.B.5.3. - Determinación de colesterol total

Del extracto lípidico se toma una alícuota del orden de 100 µl con micropipeta, llevándose a sequedad bajo corriente de nitrógeno. De la solución patrón tomamos 25, 50 y 100 µl con micropipeta, llevando a sequedad de la misma forma.

Una vez secos tanto los problemas como los patrones, agregamos 100 µl de cloroformo, agitando suavemente y comprobando que queda todo perfectamente disuelto. A continuación agregamos a todos los tubos 3 ml del reactivo A. Se agitan estos en un agitador y se van disponiendo en un baño de agua a 25°C. Se dejan reposar de 10-15 minutos al cabo de los cuales se leen en un espectrofotómetro a 625 nm.

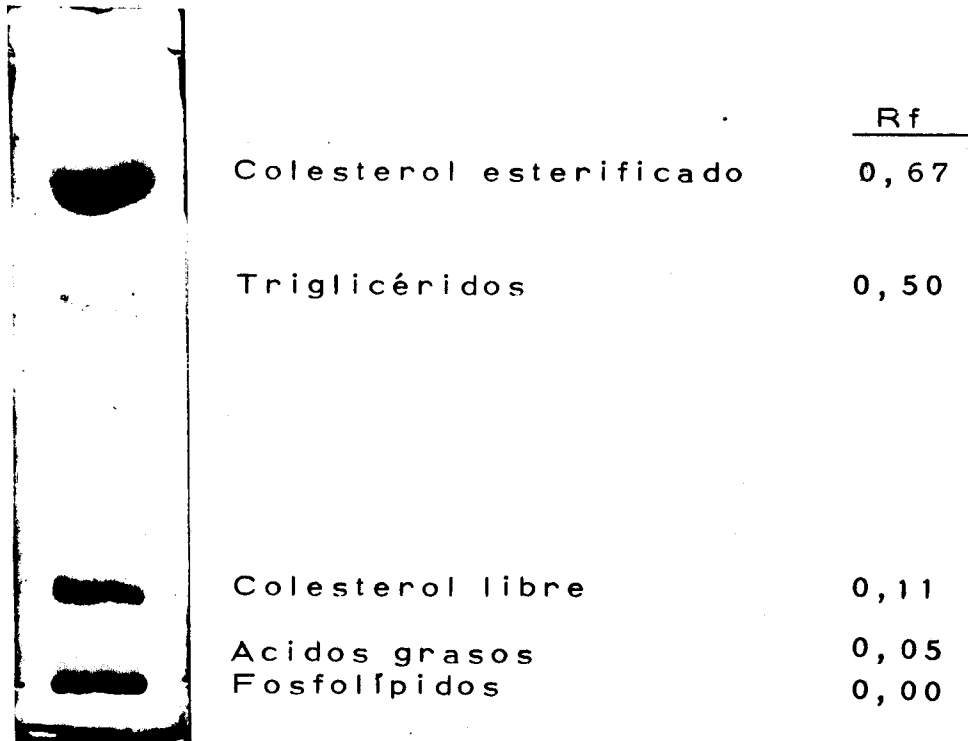
3.B.5.4. - Determinación de colesterol libre y esterificado.

Para la separación de colesterol libre y esterificado del extracto lípidico, hemos seguido la técnica de Corominas (208).

Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm., de silicagel G activadas durante una hora en estufa a 110°C. Las muestras se colocaron a 1.5 cm del borde inferior de la placa, tomando alícuotas de 100 µl del extracto lípidico. Una vez secas las muestras aplicadas se introdujo la placa en una campana de cromatografía de 56 x 56 cm, donde al menos 4h antes, se habían colocado 100 ml de la mezcla cloroformo: benceno (60:40). El líquido se dejó ascender por la placa hasta 1 cm del borde superior (aproximadamente 45 minutos). Una vez conseguido esto se sacó la placa y se secó con secador con objeto de evitar el goteo y la difusión posterior.

Inmediatamente después de secada la placa, se realizó el revelado colocando la placa en una campana con iodo sublimado. El iodo se sublima fijándose a los dobles enlaces, apareciendo una mancha de tono marrón amarillento.

Mediante este sistema se separan los siguientes compuestos:
Esteres de colesterol, triglicéridos, colesterol libre, ácidos grasos y fosfolípidos



Las manchas correspondiente a colesterol libre y esterificado se señalan con ayuda de un punzón, punteando alrededor de cada mancha. Seguidamente se introducen en una estufa hasta conseguir la desaparición del yodo.

Las zonas señaladas correspondientes a colesterol libre y esterificado se rasparon y se depositaron en sendos tubos de ensayo.

Para extraer ambos del silicagel se añadió 3 ml de la mezcla etanol: acetona : éter (1:1:1), se agitó bien y se centrifugó 15 min a 1.000 x g. El sobrenadante se decantó a otro tubo y el sedimento se volvió a tratar con 3 ml de la mezcla repitiendose la extracción. Finalmente se juntaron los sobrenadantes y se llevaron a sequedad bajo corriente de

nitrógeno determinándose el colesterol siguiendo el método descrito anteriormente.

3.B.5.6. - Cálculos

La concentración de colesterol total se calculó a partir de:

$$C_t = \frac{DOT \times a \times V_L}{V_T \times P \times V_i}$$

donde:

C_t = μ gr de colesterol por mg de proteína.

DOT = Densidad optica medida

a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en μ g/ u. D.O.

V_L = Volumen del extracto lipídico en ml.

V_T = Volumen en ml de la alícuota tomada del extracto lipídico utilizado en la colorimetría.

V_i = alícuota de la suspensión microsomal de la que se parte (ml)

P = concentración de proteínas de la suspensión microsomal (mg/ml).

La concentración de colesterol libre y esterificado, así como sus porcentajes relativos se estimaron según

$$C_L = \frac{DOL \times a \times V_L}{V_p \times P \times V_i} \quad ; \quad C_E = \frac{DOE \times a \times V_L}{V_p \times P \times V_i}$$

$$\% C_L = \frac{C_L \times 100}{C_L C_E} ; \% C_E = \frac{C_E \times 100}{C_L C_E}$$

donde:

C_L = μg de colesterol libre por mg de proteina microsomal
 C_E = μg de colesterol esterificado por mg de proteina microsomal

DOL = Densidad óptica debida al colesterol libre

DOE = Densidad óptica debida al colesterol esterificado

$\% C_L$ = porcentaje de colesterol libre

$\% C_E$ = porcentaje de colesterol esterificado.

a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en $\mu\text{g}/\text{u. D. O.}$

V_L = Volumen del extracto lípido en ml.

V_T = Volumen en ml de la alícuota tomada del extracto lípido utilizado en la colorimetría

V_i = alícuota de la suspensión microsomal de la que se parte (ml)

P = concentración de proteínas de la suspensión microsomal (mg/ml).

3. B. 6. - Determinación de fosfolípidos

Para la determinación de fósforo total, se siguió el método de Fiske y Subbarow (209) modificado por Barteett (210).

3. B. 6. 1. - Fundamento

El fosfato presente reacciona con el ácido molíbdico para formar el ácido fosfomolíbdico el cual se reduce selectivamente por adición del ácido 1-amino-2-naftol-3-sulfónico para dar un color azul oscuro cuya

intensidad medida a 830 nm es proporcional a la cantidad de fósforo presente.

3.B.6.2. - Soluciones utilizadas

Solución patrón:

Se prepara una disolución de fosfato disódico en agua equivalente a 10 μ g / ml de P.

Molibdato amónico al 5 % (p/v):

Se disuelve 5 g de molibdato amónico, completando hasta un volumen total de 100 ml con ácido sulfúrico 2 M.

Reactivo de Fiske y Subarow:

En mortero se homogeneiza 0.1 g de 1-amino-2-naftol-3-sulfónico 6 g de metabisulfito sódico y 0.6 g de sulfito sódico anhídrico. La mezcla se disuelve en agua completando hasta un volumen de 50 ml. Para su perfecta disolución hay que calentar aproximadamente un minuto a baño maría.

3.B.6.3. - Determinación de fósforo total

Del extracto lípidico se tomaron alícuotas del orden de 25-50 μ l y de la solución patrón se tomaron 0.15, 0.3 y 0.6 ml. Se agregaron a todos los tubos 1.2 ml de perclórico del 70 %, dos gotas de molibdato amónico al 5 % y se completó hasta 2 ml con agua. Esta operación se realizó en tubos graduados de 10 ml lavados con detergente especial exento de P. Los tubos se agitaron suavemente con la mano y se colocaron en un

baño de arena tapándose con bolas de cristal, dejando que suba la temperatura hasta 180 °C para que el ácido perclórico concentrado realice la hidrólisis. El tiempo que debe estar a esta temperatura viene indicado por el momento en que todos los tubos han perdido completamente el color (aproximadamente 30 minutos). Se dejan enfriar y se añade 0.4 ml de molibdato amónico al 5 % y 0.4 ml de reactivo de Fiske y Subbarow, se completa con agua bidestilada a 10 ml, se agitan y se colocan a baño maría a 100°C durante 15 minutos para que aparezca el color azul. Finalmente se dejan enfriar y se leen en un espectrofotómetro a 830 nm.

3.B.6.4. - Determinación de los principales fosfolípidos

Para la separación de los distintos fosfolípidos de las membranas microsomales, se siguió la técnica de Vitiello and Zanetta (211).

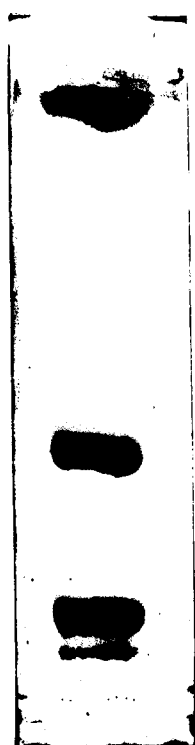
Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm de silicagel G activadas. Las muestras se colocaron a 1.5 cm del borde inferior de la placa, tomando una alícuota del extracto lipídico de 50 µl.

El desarrollo de la placa se llevó a cabo en cubetas de vidrio de 56 x 56 cm. El solvente empleado en este caso fué una mezcla de acetato de etilo : n-propanol : cloroformo: metanol: ClK 0.25 % en solución acuosa (25:25:25:10:9). Para una perfecta separación, el solvente debe añadirse a la cubeta al menos 18 horas antes de meter las placas.

Se realizó una cromatografía ascendente convencional dejando que el solvente llegara hasta el extremo superior de la placa (100 minutos). Una vez conseguido, se sacó la placa y se secó con secador, asegurándose que está perfectamente seca antes de revelarla con yodo. El revelado se realizó igual que en el caso de la separación de colesterol li-

bre y esterificado.

Una vez señaladas las manchas correspondientes a cada fosfolípido se elimina el yodo colocando la placa en una estufa. Esta quedaría de la forma siguiente:

	Lípidos neutros	<u>Rf</u> 0,87
	Sulfátidos	0,55
	Fosfatidiletanolamina	0,37
	Fosfatidilinositol	0,21
	Fosfatidilcolina Esfingomielina	0,13 0,07

Cada fosfolípido identificado se raspó de la placa y se recogió en tubos graduados de 10 ml. siguiendo la técnica anteriormente descrita por la determinación de fosfolípidos totales, introduciendo una sola variante: una vez mantenidos los tubos durante 15 minutos al baño maría, se centrifugaron éstos para que el silicagel no interfiriera en la medida, siendo el sobrenadante limpio lo que se lee en el espectrofotómetro.

3. B. 6. 5. - Cálculos

La cantidad de fósforo total se determinó por la formula,

$$P_T = \frac{DO_{pt} \times a \times V_L}{V_T \times V_i \times P}$$

DO_{pt} = densidad óptica debida al fósforo total

a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en $\mu\text{g/ u. D.O.}$

V_T = Volumen en ml de la alícuota tomada del extracto lipídico utilizado en la colorimetría.

V_L = Volumen del extracto en ml.

V_i = alícuota de la suspensión microsomal de la que se parte (ml).

P = concentración de proteínas de la suspensión microsomal (mg/ml).

El cálculo de la relación molar colesterol/fósforo se determinó según la expresión.

$$C/p = \frac{C \times Paf}{P \times Pmc}$$

C = μg colesterol por mg de proteína.

P = μg fósforo por mg de proteína.

Pmc = Peso molecular de colesterol (388,66).

Paf = Peso atómico del fósforo (30,98).

C/p = razón molar colesterol/fósforo.

Para calcular la cantidad de cada fosfolípido y su porcentaje relativo se emplearon las ecuaciones

$$P(x) = \frac{DO(x) \times a \times V_L}{V_c \times V_i \times P}$$

$$\% P(x) = \frac{P(x) \times 100}{P(\text{esq}) + P(\text{pc}) + P(\text{Pi}) + P(\text{PE})}$$

$P(x)$ = μg de fósforo por mg de proteína microsomal del fosfolípido X.

$DO(x)$ = absorbancia debida al fósforo correspondiente a X
 a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en $\mu\text{g}/\text{u. D.O.}$

V_L = Volumen de extracto lipídico en ml .

V_c = Alícuota del extracto lipídico cromatografiado en ml .

V_i = Volumen de suspensión microsomal de lo que se parte (ml).

P = concentración de proteínas microsomales en mg/ml .

Las suspensiones microsomales de partida eran mezcla de cinco pollos.

En este caso y para todas las determinaciones colorimétricas los valores obtenidos presentaron una variación inferior al 5 %.

3.B.7. - Medida de radiactividad correspondiente a dos isótopos, ^3H y ^{14}C , presentes en una misma muestra mediante centelleo líquido

Al trabajar con isótopos del tipo ^{14}C y ^3H , debemos tener presente que se trata de emisores β puros de baja energía con fenómenos de autoabsorción. Su medida se realiza en aparatos especiales que corresponden a espectrometro de centelleo líquido, donde las partículas β de la muestra se encuentran en una disolución (evitando la autoabsorción) con una serie de moléculas orgánicas que presentan fenómenos de fluorescencia al excitarse por interacción con la radiación β . Esta emisión de luz es captada por el aparato (tubo fotomultiplicador) originando un impulso eléctrico detectable ("cuenta"). La altura del impulso es proporcional a la energía de la partícula; así, las partículas β se emiten con un espectro continuo de energías desde cero hasta un máximo, dando lugar a impulsos de altura variable.

El aparato utilizado presenta cuatro canales de medida, independientes, dotados de dos discriminadores (superior e inferior), que colocados de la forma adecuada, el aparato solo detecta aquellos impulsos cuya altura corresponde con los márgenes apropiados para la medida del isótopo en cuestión. Así, un mismo aparato puede tener varios canales distintos y cada isótopo se medirá en su canal ajustando convenientemente.

Por otra parte, las medidas van acompañadas de un error, ya que no todas las cuentas que se producen durante la medida, son captadas por el aparato. Esto se debe con frecuencia a que la energía emitida por las partículas radiactivas puede ser absorbida por moléculas presentes en el medio e incapaces de excitarse, lo que da lugar al llamado

"quenching" o "extinción de la muestra". El cociente entre las cuentas acumuladas durante un minuto (c.p.m.) y las desintegraciones por minuto (d.p.m.) reales de la muestra, nos dá lo que se llama "eficiencia de contaje" que es característica de cada aparato.

$$Ef = \frac{\text{c.p.m.}}{\text{d.p.m.}}$$

Con todo esto, vemos que la medida en d.p.m. es independiente del aparato utilizado. No obstante, los equipos de medida dan solo c.p.m.; de allí la importancia de conocer la eficiencia de contaje, la cual varia con el "quenching" de la muestra, siendo necesario, por tanto, disponer de un método para poder calcular la eficiencia en cada caso. Se utiliza frecuentemente le método de la relación de canales exterior (ESR). Este utiliza la interacción por efecto Compton de una fuente externa de rayos gamma ^{133}Ba con el líquido centelleador del vial medido.

Los canales externos (5 y 6) del aparato utilizado son en realidad un solo canal provisto de tres discriminadores. Para ajustar el aparato, se utiliza un patron de baja extinción colocando los discriminadores de tal forma que el área comprendida entre la curva y el eje de abcisas sea igual en ambos canales (fig. 1)

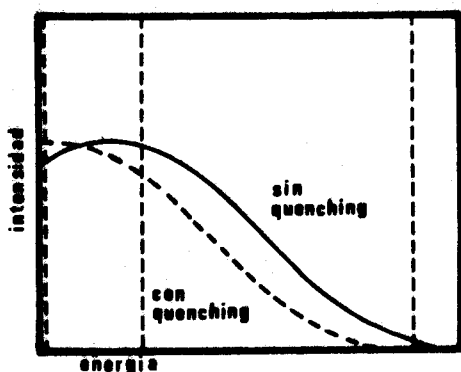


Fig. 1

Esto ocurre porque las c.p.m. detectadas en ambos canales 5 y 6 son las mismas por lo que la relación de canales externos (E.S.R.) es igual a la unidad.

Seguidamente se mide un vial con extinción de manera que el área de la zona del espectro correspondiente al canal 5 se hace mayor que la del canal 6 por lo que la relación:

$$E.S.R. = \frac{\text{c.p.m. canal 6}}{\text{c.p.m. canal 5}}$$

Esta relación es tanto menor que la unidad, cuando mayor sea la extinción en el vial.

Para poder calibrar, se utiliza una serie de patrones que contienen igual actividad del radioisotopo pero distinta cantidad de agente "quenching". Así, se calcula una función experimental que nos relaciona la eficiencia con la relación de canales externos (fig. 2).

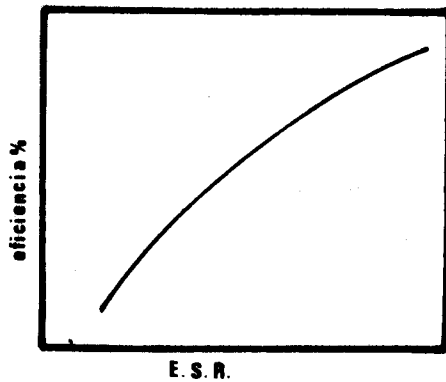


Fig. 2

Esta gráfica puede ajustarse a una función del tipo:

$$(Ef)^2 = P (ESR)^2 + Q (ESR) + R$$

Con tres parámetros P. Q. y R que mediante sistemas de calculo automático se pueden determinar a partir de la eficiencia de cada patron y su relación de canales por el método de los minimos cuadrados.

En nuestro caso de doble marcado, ocurre que tenemos dos emisores β ^3H y ^{14}C , en una misma muestra.

Como puede observarse en la fig. 3 el ^3H en un emisor menos energético que el ^{14}C aun poniendo los discriminadores de la forma más adecuada, en el canal 1 las cuentas registradas proceden casi exclusivamente del ^{14}C mientras que en el canal 2 las registradas proceden de ambos isotopos por solapamiento.

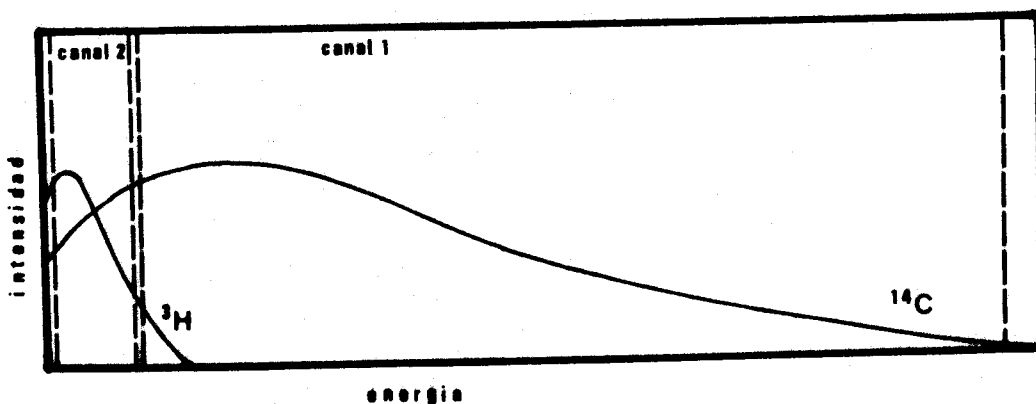


Fig. 3

Para calcular las d.p.m. debidas a cada isótopo se trabaja con 6 patrones de ambos isótopos, cada uno de ellos con igual actividad y distinta cantidad de agente "quenching". Con los patrones de ^{14}C y por el procedimiento ya mencionado se obtiene la eficiencia de conteo en el canal 1 y 2.

$$^{14}\text{C en el canal 1: Ef } (^{14}\text{C})_1 = P_1 (\text{ESR})^2 + Q (\text{ESR}) + R_1$$

$$^{14}\text{C en el canal 2: Ef } (^{14}\text{C})_2 = P_2 (\text{ESR})^2 + Q (\text{ESR}) + R_2$$

De igual forma, para los patrones de ^3H en el canal 2:

$$\text{Ef } (^3\text{H})_2 = P_3 (\text{ESR})^2 + Q_3 (\text{ESR}) + R_3$$

Los canales 5 y 6 se utilizan exclusivamente para el cálculo de los valores de E.S.R. como ya se explicó. Con los valores experimentales obtenidos con los patrones se calculan los nueve parámetros de las curvas de calibración obtenidos.

Seguidamente una muestra problema con ^3H y ^{14}C se mide durante un tiempo (minutos) acumulando C_2 cuentas en el canal 2 y C_1 cuentas en el canal 1. Sabiendo que la posible interferencia del ^3H en el canal 1 es despreciable, las c.p.m. del ^{14}C en el canal 1 serán:

$$\text{c.p.m. } (^{14}\text{C})_1 = \frac{C_1}{t} - F ; F = \text{radiación de fondo}$$

siendo entonces las d.p.m.

$$\text{d.p.m. } ^{14}\text{C} = \frac{\text{c.p.m. } ^{14}\text{C}_1}{\text{Ef } ^{14}\text{C}_1} = \frac{\frac{C_1}{t} - F}{P_1 (\text{ESR})^2 + Q_1 (\text{ESR}) + R_1}$$

En el canal 2, la interferencia del ^{14}C sí debe tomarse en cuenta. Así, las c.p.m. del ^3H en el canal 2 serán:

$$\begin{aligned}
 \text{c.p.m. } ^3\text{H}_2 &= \frac{C_2}{t} - F - \text{c.p.m. } ^{14}\text{C}_2 \\
 &= \frac{C_2}{t} - F - \text{d.p.m. } ^{14}\text{C} \times \text{Ef } ^{14}\text{C}_2 = \\
 &= \frac{C_2}{t} - F - \text{d.p.m. } ^{14}\text{C} \times [P_2 (\text{ESR})^2 + Q_2 (\text{ESR}) + R_2]
 \end{aligned}$$

de donde la radiactividad debida al ^3H será:

$$\text{d.p.m. } ^3\text{H} = \frac{\text{c.p.m. } ^3\text{H}_2}{\text{Ef } ^3\text{H}_2} = \frac{\frac{C_2}{t} - F - \text{d.p.m. } ^{14}\text{C} \times [P_2 (\text{ESR})^2 + Q_2 (\text{ESR}) + R_2]}{P_3 (\text{ESR})^2 + Q_3 (\text{ESR}) + R_3}$$

Estas formulas se han utilizado siempre para los calculos del doble marcado.

Hay que tener presente que la resolución aumenta cuanto mayor es la radiactividad del ^3H frente a la del ^{14}C , por lo que se procuró en todas las experiencias poner de 3-6 veces mayor radiactividad de ^3H que de ^{14}C .

IV RESULTADOS

4. A. - ESTUDIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA DETERMINA- CION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA

Teniendo presente la localización microsomal del HMG-CoA reductasa, hecho reconocido en numerosos trabajos, se ha tratado de establecer las condiciones óptimas de su determinación en pollos de corta edad. Con este propósito se realizaron una serie de experiencias que describimos a continuación.

4. A. 1. - Separación y recuperación del producto de la reacción

Para separar el sustrato (HMG-CoA) del producto de reacción (MVA) se utiliza cromatografía en capa fina como ya se indicó en la parte experimental. Ahora bien; el revelado de la misma tenía el inconveniente de interferir como "agente quenching" en la medida de radiactividad. Por ello, ha sido necesario en todos los casos determinar el producto de la reacción sin revelar basandose en su valor Rf.

Para establecer el Rf y comprobar la recuperación de la cromatografía se diseñaron experiencias donde se simulaba una reacción normal. De esta forma, primero se cromatografió el producto marcado con ^3H y ^{14}C , ambos por separado, raspandose las placas a intervalos de Rf de 0.1.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I y figura 4 donde se puede apreciar que la MVA lactona, en ambos casos, se encuentra entre valores de Rf 0.3-0.5. De la ^3H -MVA lactona se cromatografió una cantidad correspondiente a 25455 d.p.m. recuperándose en ese intervalo 17992 (10.6%). Para la ^{14}C -MVA lactona, se cromatografió 5916 d.p.m. recuperándose en el mismo Rf 3785 d.p.m. (63.97%).

Para estudiar el proceso de una reacción normal se cromatografió una mezcla de sustrato y producto en las proporciones habituales de reacción. Así, se pusieron 50457 d.p.m. de ^{14}C -HMG-CoA y 5916 d.p.m. de ^{14}C -MVA lactona. Observándose como se muestra en la tabla II y figura 5-A, que el Rf para la ^{14}C -MVA lactona no varía y el del ^{14}C -HMG-CoA es de 0.0-0.2 como se demuestra en la fig. 5-B donde solo se ha cromatografiado ^{14}C -HMG-CoA. En estas experiencias la recuperación de la ^{14}C -MVA-lactona fué de un 65.4 %.

Para asegurarnos que la cantidad de silicagel raspado de la placa, no afectaba la medida de radiactividad, se realizaron varias medidas de una misma muestra radiactiva colocada en viales con distinto peso de silicagel. Esto se hizo tanto con ^{14}C como con ^3H pensando que se afectarían de forma distinta por ser uno más energético que el otro. Los resultados se expresan en la tabla III, donde podemos apreciar, en ambos casos, un pequeño aumento en los d.p.m. al aumentar el peso de silicagel pero también un descenso en el valor de la relación de canales externos lo que nos indica una medida peor y por tanto menos fiable.

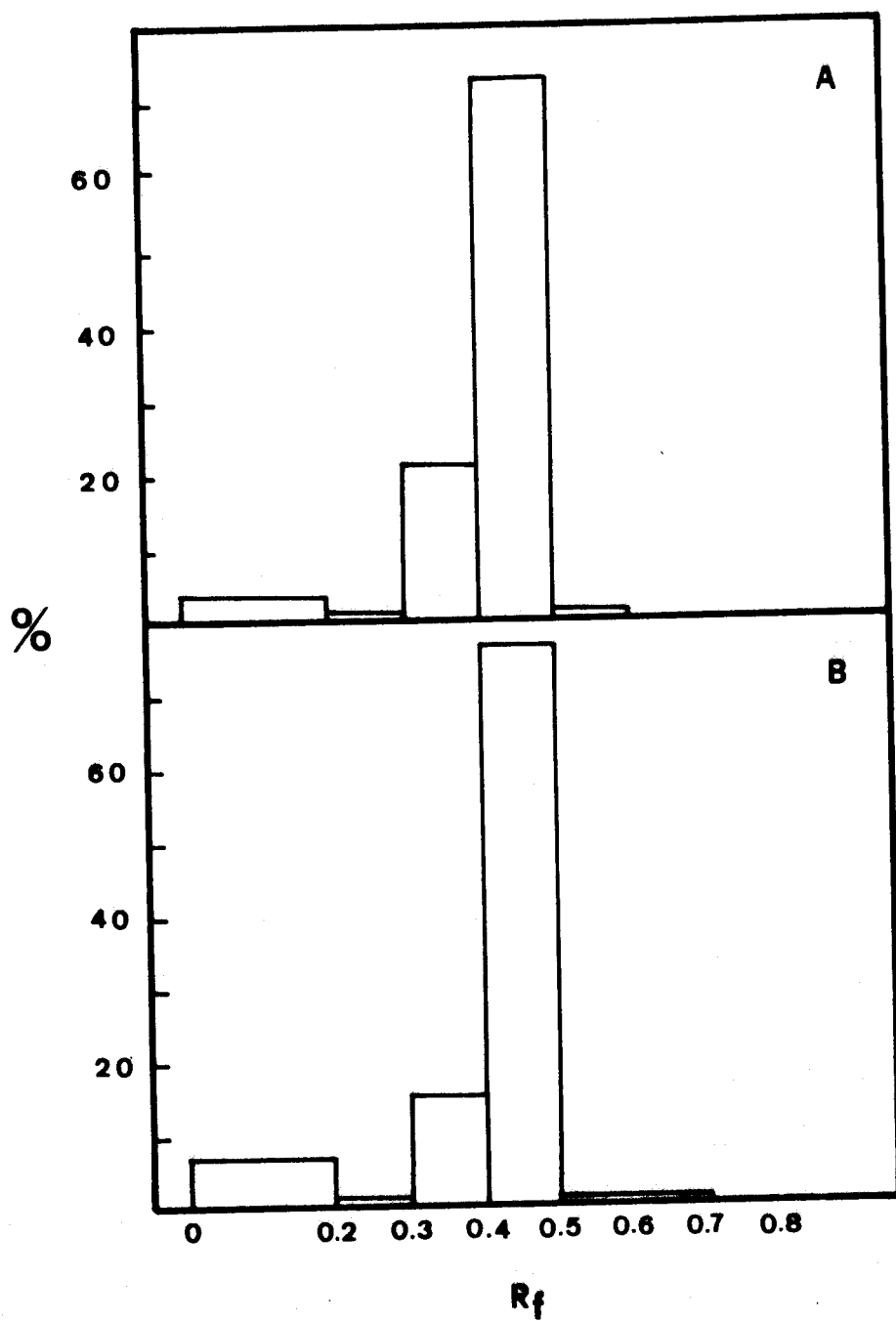
Por otra parte, algunos autores que trabajan en otros orígenes hablan de una hidrólisis posiblemente enzimática del sustrato, dando HMG libre y CoA-SH. En el sistema de identificación usado, el HMG tiene

TABLA I

Determinación del R_f correspondiente al producto de la reacción. Cromatografía en capa fina de la MVA lactona marcado con ^3H ó con ^{14}C .

R_F	$(^{14}\text{C})\text{-MVA-LAC}$		$(^3\text{H})\text{-MVA-LAC}$	
	d. p. m.	%	d. p. m.	%
0 - 0.2	276 ± 81.5	6.7 ± 2.0	619 ± 38.0	3.2 ± 0.2
0.2 - 0.3	30 ± 3.3	0.7 ± 0.1	131 ± 20.5	0.7 ± 0.1
0.3 - 0.4	624 ± 3.9	15.1 ± 0.1	4062 ± 1032.5	21.4 ± 5.4
0.4 - 0.5	3161 ± 7.3	76.6 ± 0.2	13930 ± 2423.5	73.3 ± 12.7
0.5 - 0.6	15 ± 2.1	0.4 ± 0.1	151 ± 31.0	0.8 ± 0.2
0.6 - 0.7	15 ± 0.5	0.4 ± 0.1	100 ± 6.5	0.5 ± 0.1
0.7 - 0.8	----	----	----	----
0.8 - 1	----	----	----	----

FIGURA 4



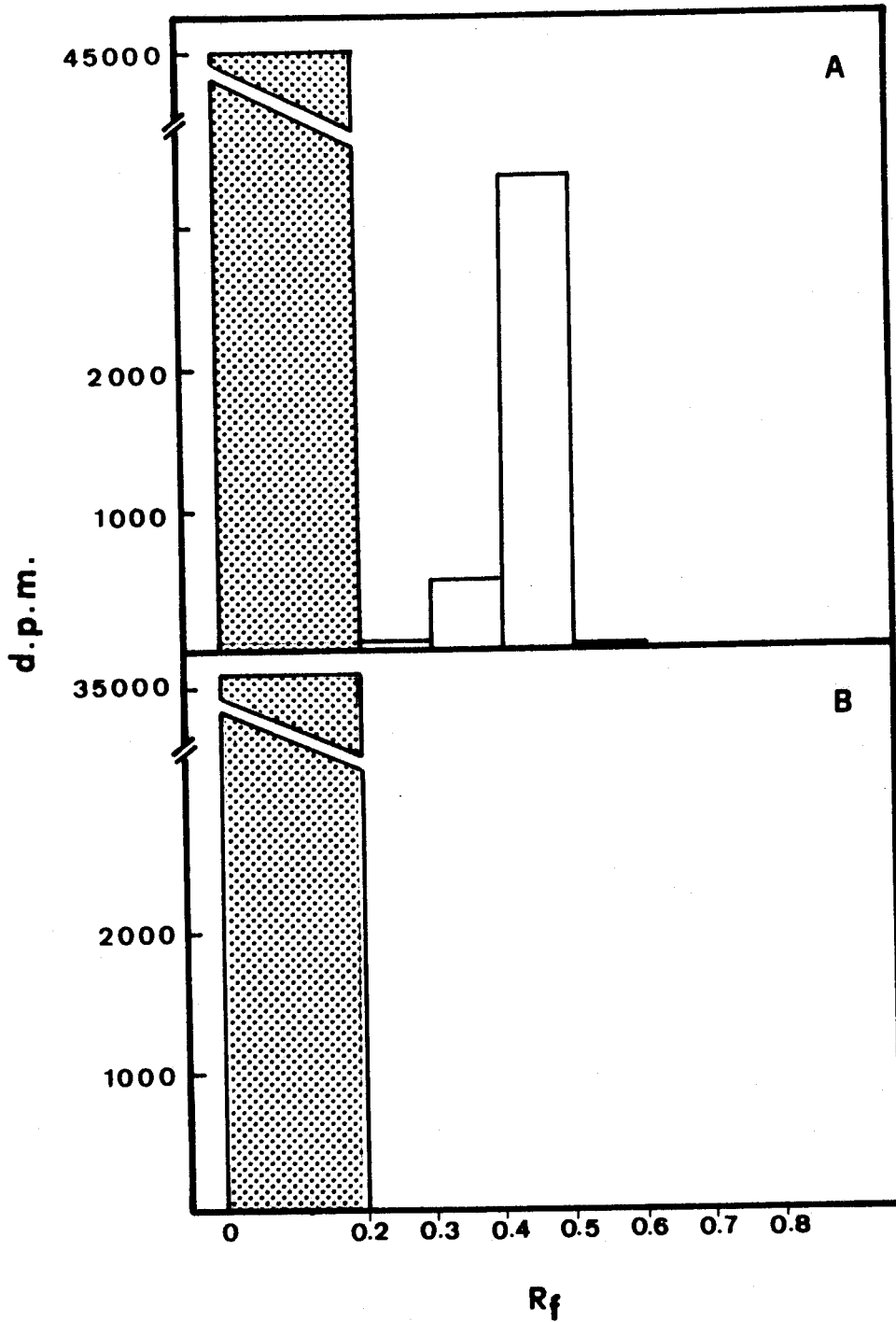
Identificación del producto de la reacción. A : cromatografía en capa fina del ^3H -MVA-lactona. B : cromatografía en capa fina del ^{14}C -MVA-lactona.

TABLA II

Separación del sustrato y producto de la reacción. Cromatografía en capa fina del sustrato ^{14}C -HMG-CoA y cromatografía en capa fina de una mezcla de ^{14}C -HMG-CoA y ^{14}C -MVA lactona.

R_F	HMG-CoA d.p.m.	HMG-CoA+MVA lacto. d.p.m.
0 - 0.2	37661 \pm 796.8	45272 \pm 686.3
0.2 - 0.3	44 \pm 25.4	61 \pm 16.3
0.3 - 0.4	11 \pm 1.8	518 \pm 40.3
0.4 - 0.5	14 \pm 1.6	3355 \pm 77.1
0.5 - 0.6	8 \pm 4.1	12 \pm 7.1
0.6 - 0.7	10 \pm 5.5	31 \pm 2.7
0.7 - 0.8	-----	9 \pm 0.7
0.8 - 1	-----	8 \pm 1.0

FIGURA 5



Identificación del sustrato y del producto de la reacción. A: cromatografía en capa fina en una mezcla de ¹⁴C-HMG-CoA (⊘) y ¹⁴C-MVA lactona (□). B: cromatografía en capa fina de ¹⁴C-HMG-CoA (⊘).

TABLA III

Influencia del silicagel en las medidas de radiactividad. Los resultados corresponden a una misma actividad del radioisótopo (^3H ó ^{14}C) medidos con distintas cantidades de silicagel.

^{14}C			^3H		
Peso (g)	d. p. m.	E. S. R.	Peso (g)	d. p. m.	E. S. R.
Silicagel			Silicagel		
0.132	9231	0.627	0.122	50295	0.618
0.172	9178	0.625	0.179	48344	0.606
0.238	9118	0.594	0.233	50160	0.599
0.326	9318	0.564	0.532	55755	0.515
0.473	9470	0.547	0.736	57825	0.483

un Rf próximo al de la MVA-lactona. Para descartar una posible medida de ^{14}C -HMG en la zona de la MVA-lactona, se hicieron una serie de reacciones con extractos de hígado y cerebro, donde se pusieron unos controles con sistema regenerante y los mismo sin él. Los resultados se muestran en la tabla IV. En ella podemos ver que en ambos tejidos esta posible hidrólisis del sustrato es despreciable para las condiciones normales de trabajo.

4.A.2. - Obtención de las preparaciones enzimáticas: condiciones óptimas

La preparación de los extractos microsomales se realizó en un medio tamponado, como ya se indicó en la Parte Experimental al cual se le añaden una serie de "protectores" requeridos en distintas concentraciones. Debido a que las concentraciones encontradas en la bibliografía variaban con el autor e incluso dentro de una misma especie ensayada, decidimos determinarlas para nuestro caso, en una serie de experiencias donde íbamos variando en cada una un protector manteniendo los demás a la concentración dada por Shapiro (135).

4.A.2.1. - Influencia del DTT

Se realizaron una serie de determinaciones enzimáticas con microsomas resuspendidos en tampón fosfato 50 mM, que contenía EDTA 30 mM, CINA 0.25 M, y cantidades crecientes de DTT (de 0 a 10 mM) con un pH de 7.4. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V (fig.6), donde el máximo de actividad corresponde a una concentración de 1 mM, lo cual concuerda con el valor dado por Shapiro y utilizado por nosotros.

TABLA IV

Efecto de una posible hidrólisis del HMG-CoA en la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando unos extractos de hígado y cerebro con el sistema regenerante y otros sin él. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro determinaciones. El \pm representa el error estándar de la media.

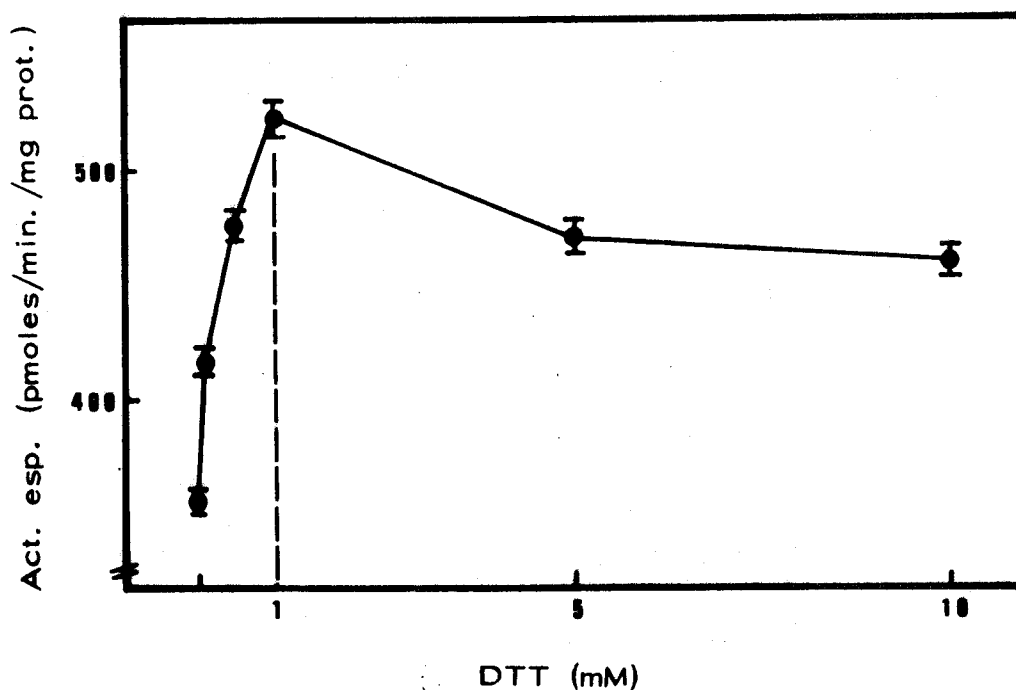
Organo	Proteínas (mg)	Actividad específica (pmoles/min/mg)	
		Con sistema regenerante	Sin sistema regenerante
Hígado	0.1	60.3 \pm 0.9	2.5 \pm 0.1
Hígado	0.3	158.2 \pm 1.4	2.4 \pm 0.1
Hígado	0.5	230.8 \pm 0.2	3.8 \pm 0.2
Cerebro	0.05	43.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1
Cerebro	0.3	176.8 \pm 1.9	4.3 \pm 0.2
Cerebro	0.6	261.8 \pm 15.3	3.1 \pm 0.3

TABLA V

Influencia del contenido en ditiotreitól del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa. Los microsomas se resuspendieron en tampon con distintas concentraciones de DTT, manteniendo los demas protectores constantes. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones \pm el error estandar de la media.

D. T. T. (mM)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
0	356.1 \pm 5.2
0.1	417.4 \pm 5.1
0.5	477.5 \pm 6.3
1	520.3 \pm 8.7
5	470.5 \pm 6.4
10	461.1 \pm 7.6

FIGURA 6



Efecto del contenido en ditiotreitól del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa en microsomas de hígado resuspendidos en tampon con distintas concentraciones de DTT, manteniendo el resto de los protectores constantes. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro determinaciones \pm el error estandar de la media.

4. A. 2. 2. - Influencia del CINa

En este caso se varió la concentración de CINa de 0 a 1 M y el resto de los protectores se mantuvieron a una concentración: EDTA 30 mM, DTT 1 mM en tampón fosfato pH 7.4. Los valores correspondientes a las determinaciones enzimáticas se expresan en la tabla VI y fig. 7. En ellos se puede apreciar un máximo de actividad reductasa a una concentración de CINa de 0.25 M y lo cual concuerda asimismo con lo indicado en el método de Shapiro.

4. A. 2. 3. - Influencia del EDTA. -

El extracto microsomal resuspendido en tampón fosfato contenía DTT 1 mM, CINa 0.25 M y concentraciones crecientes de EDTA (de 0 a 50 mM). Se determinó la actividad reductasa encontrándose que, para concentraciones de 10 a 40 mM, la actividad no variaba, incrementando ligeramente a una concentración de 50 mM como podemos ver en la tabla VII y fig 8. A la vista de los resultados, se utilizó una concentración intermedia (30 mM₂) como describe Shapiro, ya que a concentraciones superiores el pH del tampón aumentaba siendo difícil de ajustarlo.

4. A. 2. 4. - Interferencia de los componentes del tampón en la determinación de proteínas.

Según un elevado número de autores, la determinación de proteínas del extracto microsomal por el método de Lowry, se veía afectado por la concentración de protectores presentes en el tampón especialmente el DTT. Estos autores precipitan las proteínas microsomales en medio ácido posteriormente las resuspenden en álcali para su determinación.

TABLA VI

Efecto de la concentración de cloruro sódico del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

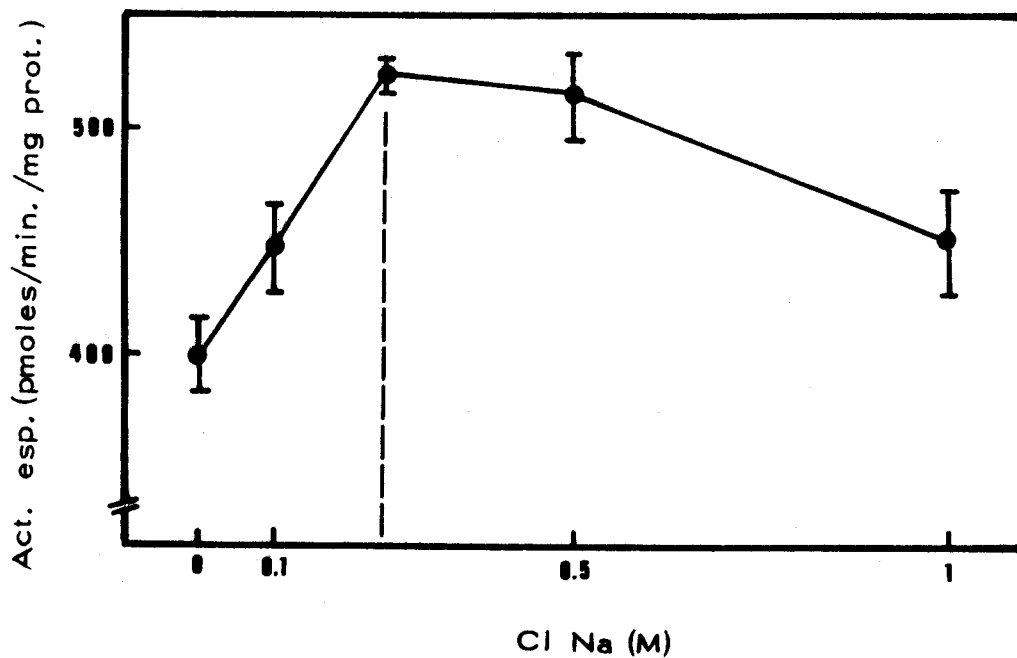
CINa (M)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
0	399.2 ± 17.5
0.1	448.8 ± 21.5
0.25	520.3 ± 8.7
0.5	516.8 ± 22.2
1	451.3 ± 26.3

TABLA VII

Influencia de la concentración de EDTA del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

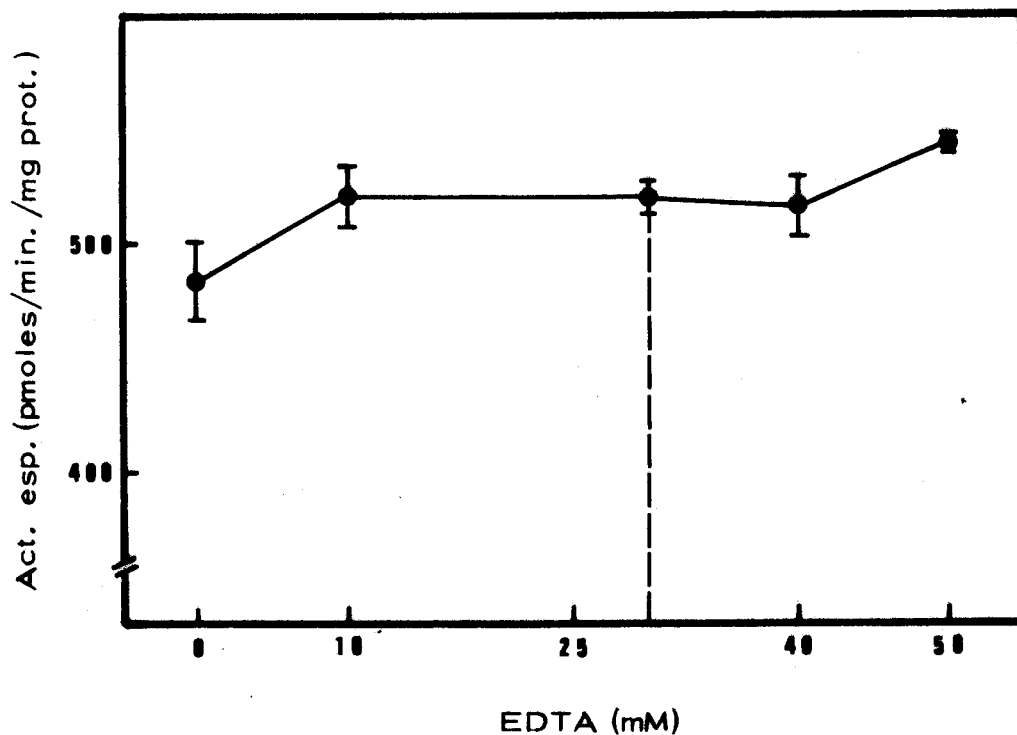
EDTA (mM)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
0	482.6 ± 18.1
10	521.6 ± 13.9
30	520.3 ± 8.7
40	517.8 ± 16.6
50	543.3 ± 4.1

FIGURA 7



Influencia del contenido en cloruro sódico del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa. Los resultados corresponden a la actividad reductasa en microsomas de hígado a concentraciones distintas de ClNa en el tampon fosfato, manteniendo los demas protectores constantes. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro determinaciones \pm el error estandar de la media.

FIGURA 8



Efecto de la concentración de EDTA del tampon fosfato sobre la actividad HMG-CoA reductasa. La determinación enzimática se realizó en microsomas de hígado resuspendidos en un medio tamponado que contenía concentraciones crecientes de EDTA y cantidades fijas de DTT y ClNa. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro determinaciones \pm el error estandar de la media.

Para asegurar la necesidad de hacer todo esto, se determinaron proteínas de un mismo extracto microsomal resuspendido en cada caso en tampón fosfato conteniendo distintas concentraciones de protectores. Así, de igual manera que en los casos descritos anteriormente, al tampón se le añadían distintas concentraciones de un protector, manteniendo constantes los otros dos, ajustándose siempre a pH 7.4. Los resultados que se obtuvieron se representan en la fig. 9 y tabla VIII; donde se observa que las concentraciones de protectores utilizadas por nosotros no afectan a la determinación de proteínas.

4.A.3.- Influencia del tiempo de reacción

Con objeto de determinar el tiempo óptimo de la reacción enzimática se realizaron experiencias en hígado determinándose la actividad enzimática a distintos tiempos, en un intervalo de 5-60 minutos, observándose un aumento de la actividad hasta los 60 minutos (tabla IX fig. 10). Por este motivo, las experiencias se llevaron a cabo incubando durante 30 min.

4.A.4.- Influencia de la cantidad de proteínas

Para poder trabajar con una cantidad de enzima un tanto flexible, debía conocerse el intervalo de proteína microsomal para el cual existiera proporción con la actividad reductasa. Esto se estudió en los tres tejidos que hemos trabajado: hígado, cerebro y asa duodenal.

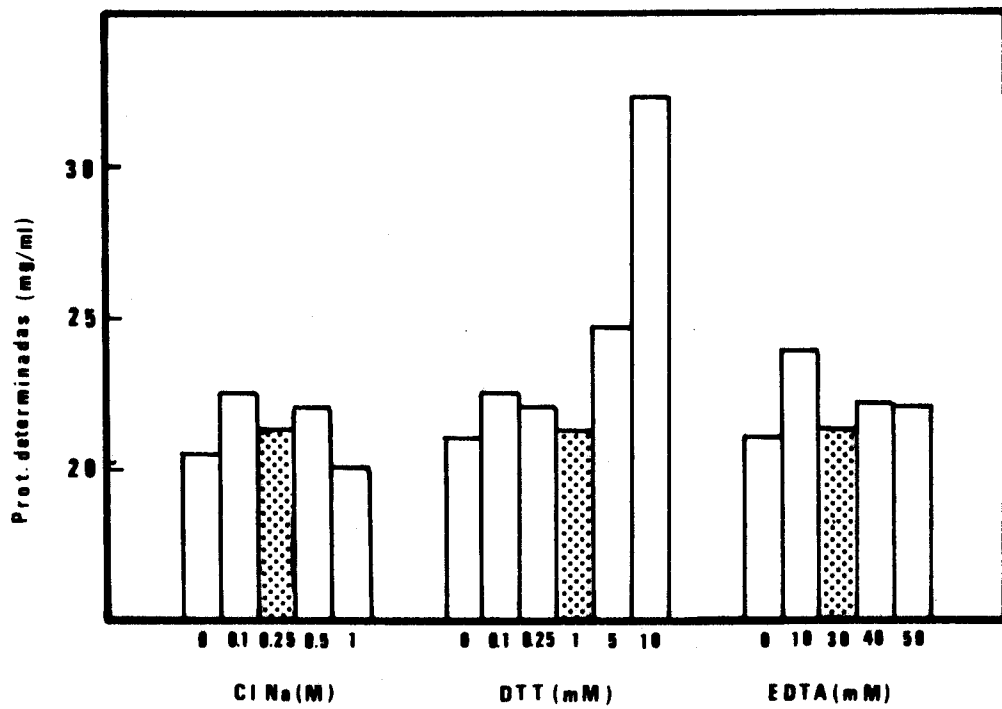
La tabla X (fig. 11) muestra los resultados correspondientes a extractos de hígado donde se determinó actividad reductasa con una cantidad de proteínas microsomas de 0.1 a 0.5 mg en el tubo de reacción,

TABLA VIII

Los microsomas de hígado con igual concentración protéica se resuspendieron en tampón con distintas concentraciones de protectores, analizando el contenido protéico.

CINa		DTT		EDTA	
Conc. (M)	Prot. determ. (mg/ml)	Conc. (mM)	Prot. determ. (mg/ml)	Conc. (mM)	Prot. determ. (mg/ml)
0	20.5	0	21.00	0	21.00
0.1	22.55	0.1	22.55	10	23.85
0.25	21.25	0.5	22.05	30	21.25
0.5	22.05	1	21.25	40	22.05
1.0	20.00	5	24.6	50	22.00
		10	32.25		

FIGURA 9



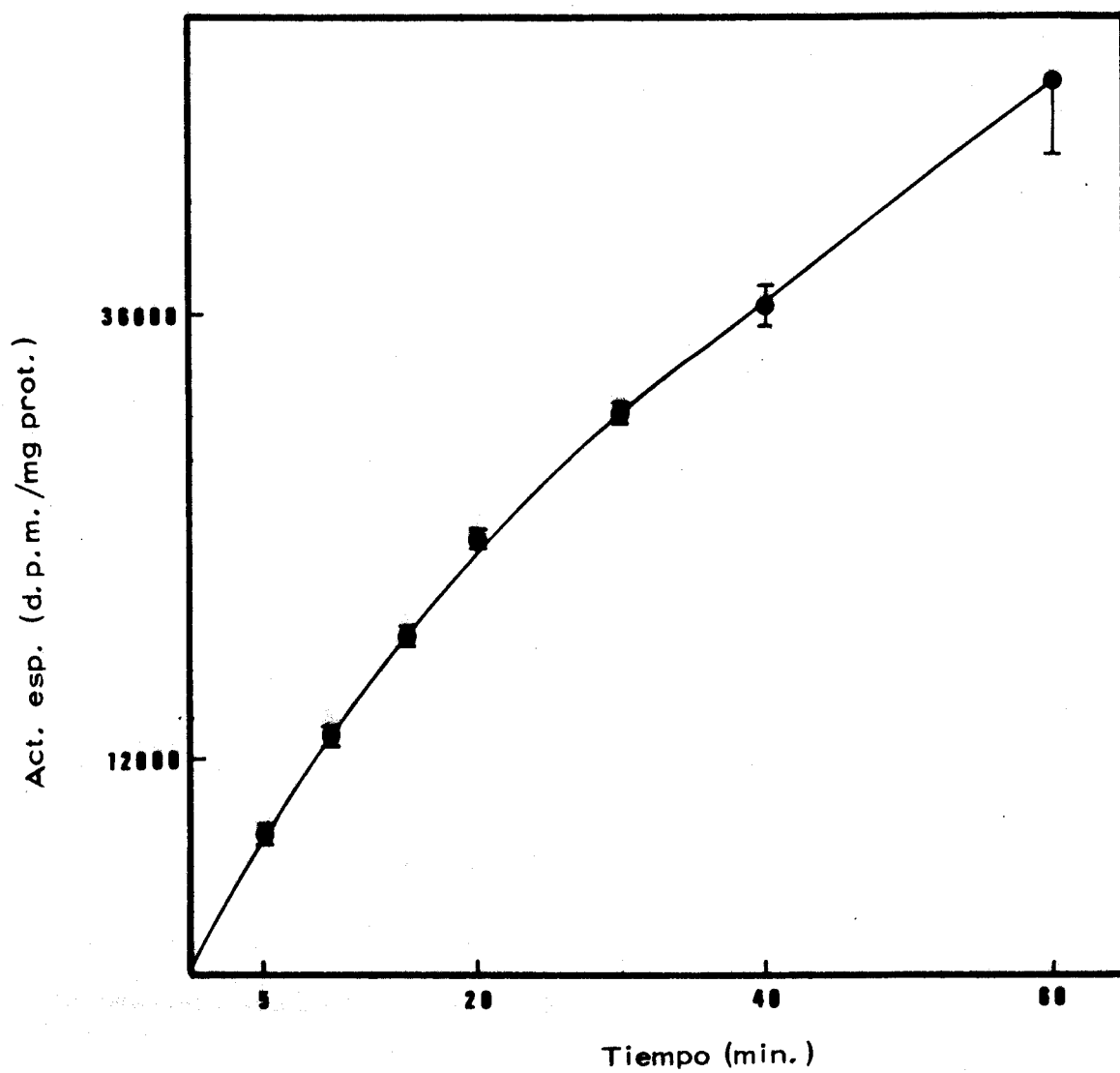
Efecto de los protectores presentes en el tampón sobre la determinación proteica por el método de Lowry. (▨) Concentraciones utilizadas en las determinaciones enzimáticas.

TABLA IX

Influencia del tiempo de reacción sobre la actividad HMG-CoA reductasa. Los resultados se expresan como media de cuatro valores. El \pm representa el error estandar de la media.

Tiempo (min)	Act. Esp. (d.p.m. / mg)
5	8160 \pm 276
10	13420 \pm 396
15	18760 \pm 368
20	24000 \pm 432
30	30360 \pm 756
40	36464 \pm 1340
60	48488 \pm 4140

FIGURA 10



Influencia del tiempo de incubación de la reacción enzimática sobre la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas hepáticos.

TABLA X

Actividad HMG-CoA reductasa de hígado en función de la cantidad de proteínas microsomales añadidas

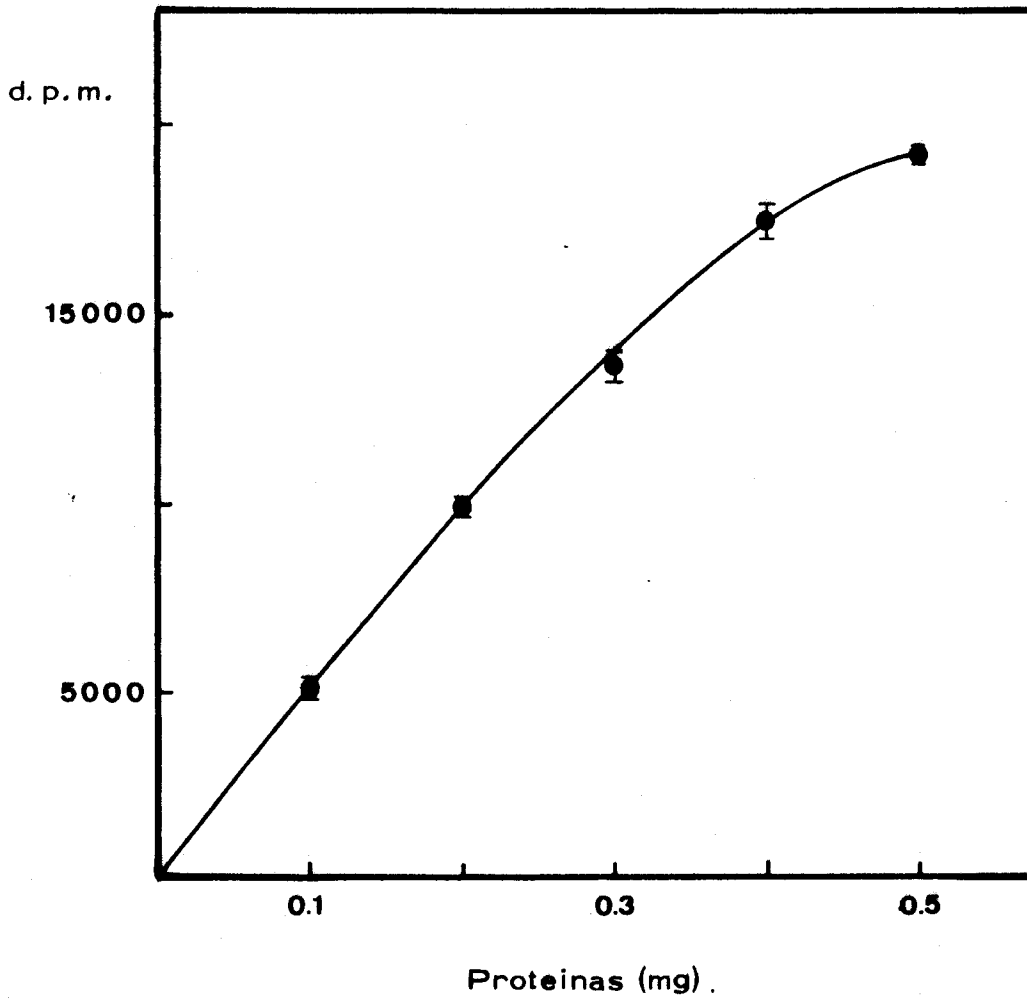
Proteínas (mg)	Actividad (d.p.m.)
0.1	5021 ± 74.7
0.2	9987 ± 10
0.3	13572 ± 113.2
0.4	17479 ± 316.4
0.5	19217 ± 20

TABLA XI

Actividad HMG-CoA reductasa de cerebro en función de la cantidad de proteínas microsomales añadidas.

Proteínas (mg)	Actividad (d.p.m.)
0.05	3588 ± 7.9
0.1	6198 ± 56.3
0.2	11900 ± 537.5
0.3	14721 ± 1596.3
0.4	19795 ± 103.2
0.5	22644 ± 44.3

FIGURA 11



Influencia de la concentración de proteínas microsomales sobre la actividad HMG-CoA reductasa de hígado de pollos. Las d.p.m. corresponden a la mitad del volumen de reacción cromatografiado.

pudiéndose apreciar linealidad de 0.1 a 0.4 mg.

En la tabla XI (fig. 12) se expresa la variación de la actividad reductasa de cerebro en función de la concentración de proteínas microsomales, viéndose que se mantiene una proporcionabilidad de 0.1 a 0.4 mg de proteína.

De igual manera se estudió la actividad reductasa de asa duodenal con distinta cantidad de enzima, apreciándose una linealidad entre 0.1 y 0.6 mg de proteína (tabla XII y fig. 13).

4.A.5.- Estabilidad de la actividad reductasa

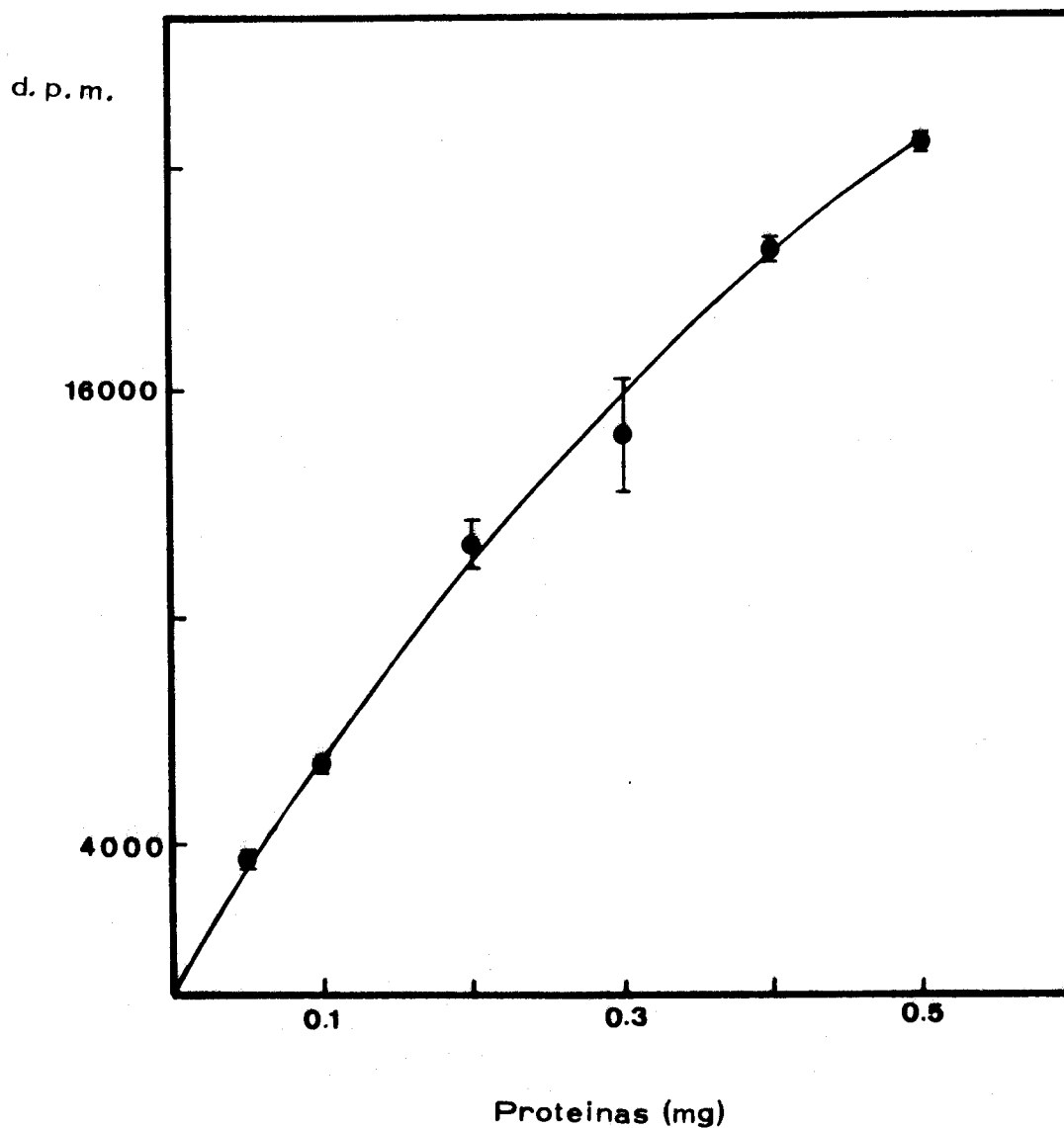
4.A.5.1.- Conservación de los microsomas

Una vez separada la fracción microsomal debía comprobarse que en el tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta la determinación enzimática, la HMG-CoA reductasa no perdía actividad durante un periodo de tiempo prudencial. Así, se estudió la variación de la actividad reductasa microsomal conservada a 4°C. El tiempo 0 se consideró en el momento de obtener el extracto microsomal. Las determinaciones se realizaron hasta las 48 horas siguientes pudiéndose apreciar como muestra la tabla XIII (fig. 14) que la actividad reductasa varía muy poco en las 7 primeras horas descendiendo algo más a las 24 horas y quedando reducida a la mitad en 48 horas. Por ello, todas las determinaciones se hicieron antes de transcurrir 7 horas desde la obtención de los microsomas.

4.A.5.2.- Efecto del ión F^-

En algunos estudios sobre la HMG-CoA reductasa se habla

FIGURA 12



Influencia de la concentración de proteínas microsomales sobre la actividad HMG-CoA reductasa de cerebro de pollo. Las d.p.m. corresponden a la mitad del volumen de reacción cromatografiado.

TABLA XII

Actividad HmG-CoA reductasa de asa duodenal en función de la cantidad de proteínas microsomales añadidas. Los \pm corresponden al error estándar de la media.

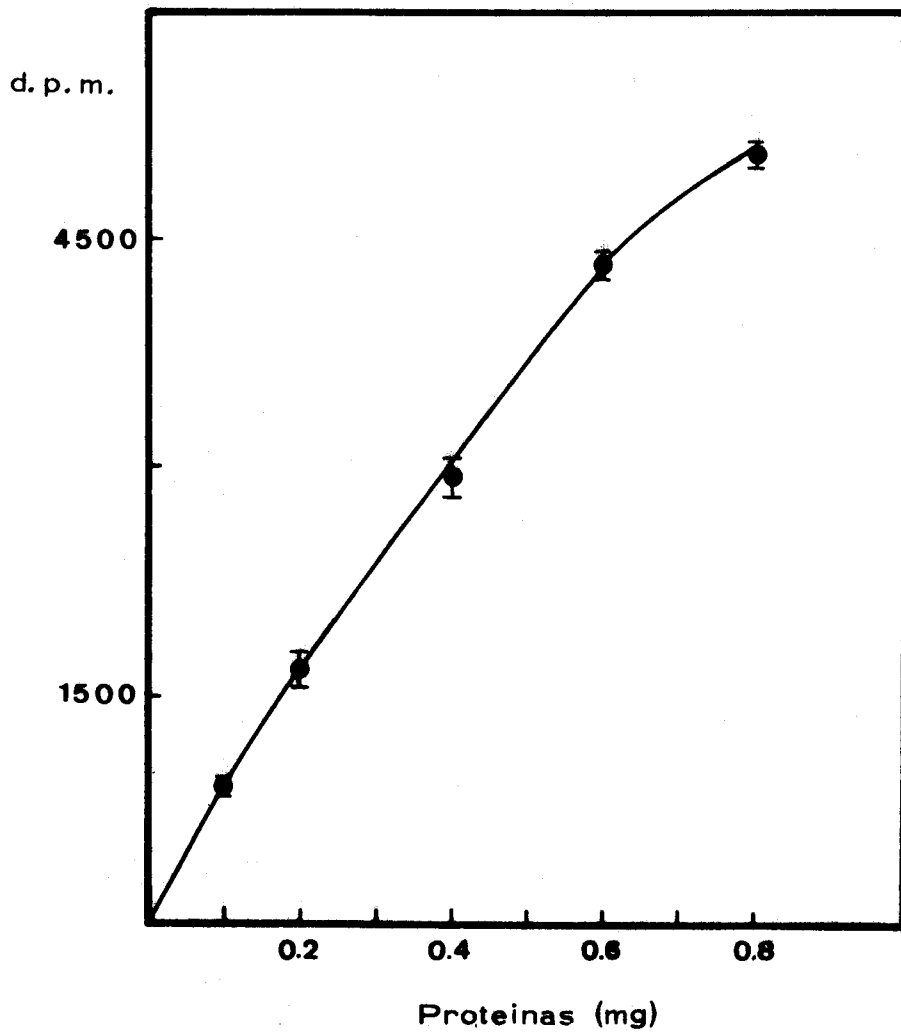
Proteína (mg)	Actividad (d.p.m.)
0.1	929 \pm 18
0.2	1687 \pm 139
0.4	2931 \pm 124
0.6	4033 \pm 48
0.8	5068 \pm 28

TABLA XIII

Estabilidad de la HMG-CoA reductasa durante las 48 horas que siguen a la obtención de los microsomas

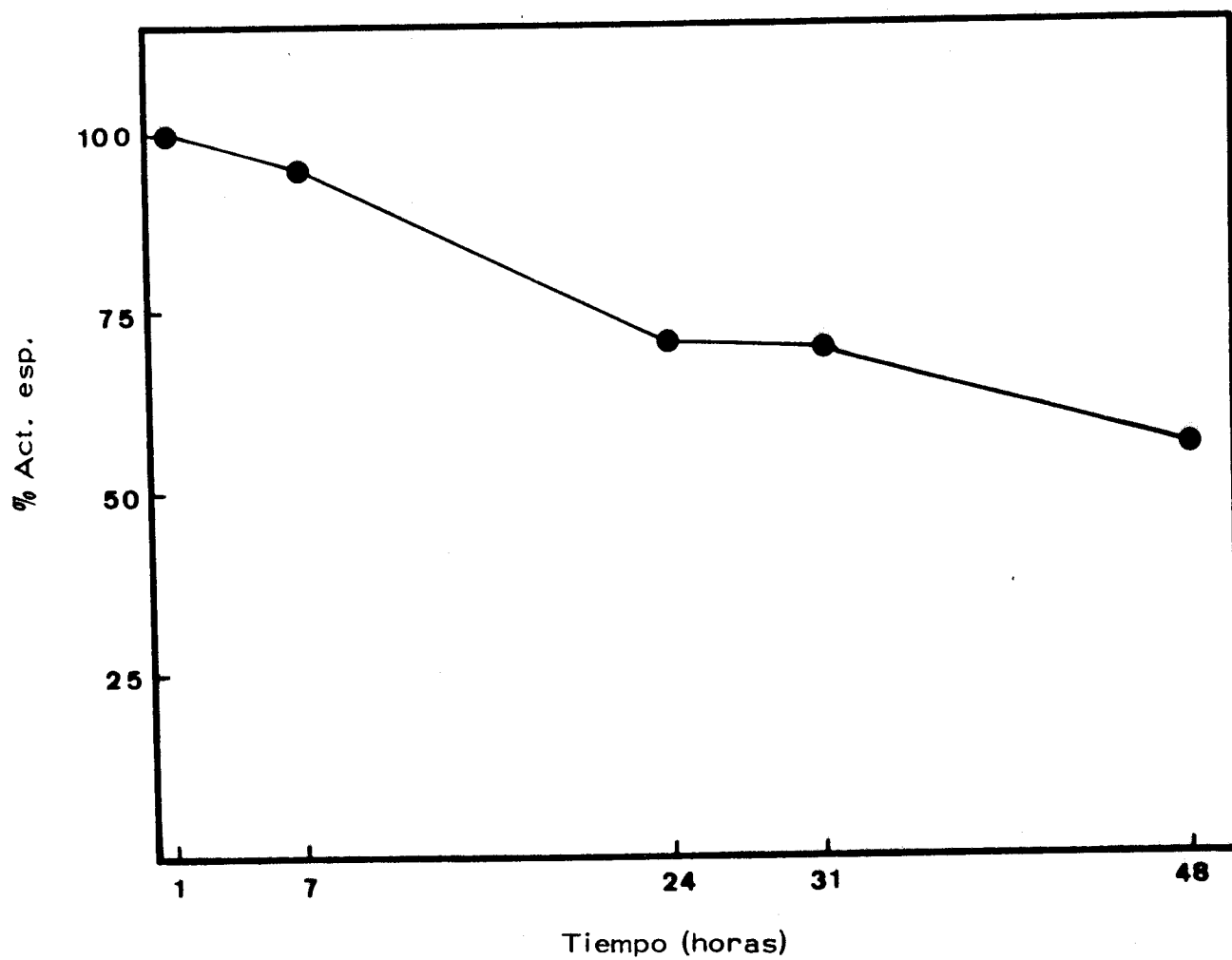
Tiempo (h)	Actividad esp. (d.p.m. /min. /mg)	%
1	1723 \pm 78	100
7	1639 \pm 179.6	95.1
24	1221 \pm 17.0	70.8
31	1219 \pm 39.6	70.7
48	975 \pm 35.4	56.6

FIGURA 13



Influencia de la concentración de proteínas microsomales sobre la actividad HMG-CoA reductasa de asa duodenal. Las d.p.m., corresponden a la mitad del volumen de reacción cromatografiado.

FIGURA 14



Estabilidad de la HMG-CoA reductasa microsomal mantenida a 4°C durante un intervalo de 1-48 horas.

de la existencia de dos formas enzimáticas, una activa y otra inactiva. Estos autores apuntan que, la forma inactiva puede pasar a forma activa por acción de una fosfatasa, lo cual supondría una posible activación de la reductasa durante el proceso de extracción de los microsomas, e incluso aún después de separarlos ya que, no se aclara si la fosfatasa es citoplasmática o microsomal. Incluso se apunta que puede encontrarse en ambos lugares.

Todo esto nos llevó a estudiar el posible efecto de esta fosfatasa, sobre las actividades de la reductasa. Así, se utilizaron extractos controles de hígado donde el tampón de extracción era el usado habitualmente, y otros problemas donde el tampón llevaba además FK 50 mM. como agente inhibidor de la fosfatasa. De esta manera, los extractos con ión F^- deberían presentar menor actividad reductasa que los controles. Así, se hicieron varias determinaciones enzimáticas a distintas horas y los resultados que se muestran en la tabla XIV nos indican que no hay variación apreciable entre los extractos controles y los problemas.

TABLA XIV

Efecto del ión F^- sobre la actividad HMG-CoA reductasa. Las reacciones se llevaron a cabo con adición de FK 50 mM al tampon usado para la obtención de los microsomas, determinando la actividad al cabo del tiempo expresado en cada caso

Tiempo(h)	d.p.m. / min	
	Sin F^-	Con F^-
01:30	689.4 ± 31.2	673.3 ± 18.8
07:30	654.6 ± 68.2	629.7 ± 68.8
24:00	491.9 ± 8.77	455.4 ± 13.7
32:00	488.0 ± 15.9	420.6 ± 16
48.00	390.3 ± 14.2	427.0 ± 19.6

TABLA XV

Influencia de la edad sobre la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El ± representa el error estandar de la media.

Edad (días)	Act. esp. (pmoles/min/mg)	Edad (días)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
1	22.5 ± 1.7	9	878.5 ± 77.7
3	21.9 ± 4.8	11	942.9 ± 195.4
4	40.4 ± 5.2	12	1026.6 ± 93.0
5	17.7 ± 6.0	13	1076.4 ± 73.7
6	311.8 ± 9.9	14	943.7 ± 187.0
7	372.5 ± 104.6	15	973.8 ± 93.4
8	653.5 ± 104.5	16	1028.3 ± 48.2

4. B. - EVOLUCION ENZIMATICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA A LO LARGO DEL DESARROLLO POSTNATAL.

Teniendo en cuenta los cambios metabólicos que tienen lugar tras el nacimiento de los animales, nos pareció interesante estudiar las variaciones que sufría la actividad reductasa en pollo durante las primeras semanas que siguen a la eclosión.

4. B. 1. - Condiciones de crecimiento estandar

Cada una de las experiencias realizadas sobre la HMG-CoA reductasa a lo largo de la edad, en los tres tejidos estudiados (hígado, cerebro y asa duodenal), se llevaron a cabo, utilizando una misma camada de pollos para todos los días estudiados, con idea de evitar posibles fluctuaciones que no correspondieran con variaciones normales a la actividad reductasa.

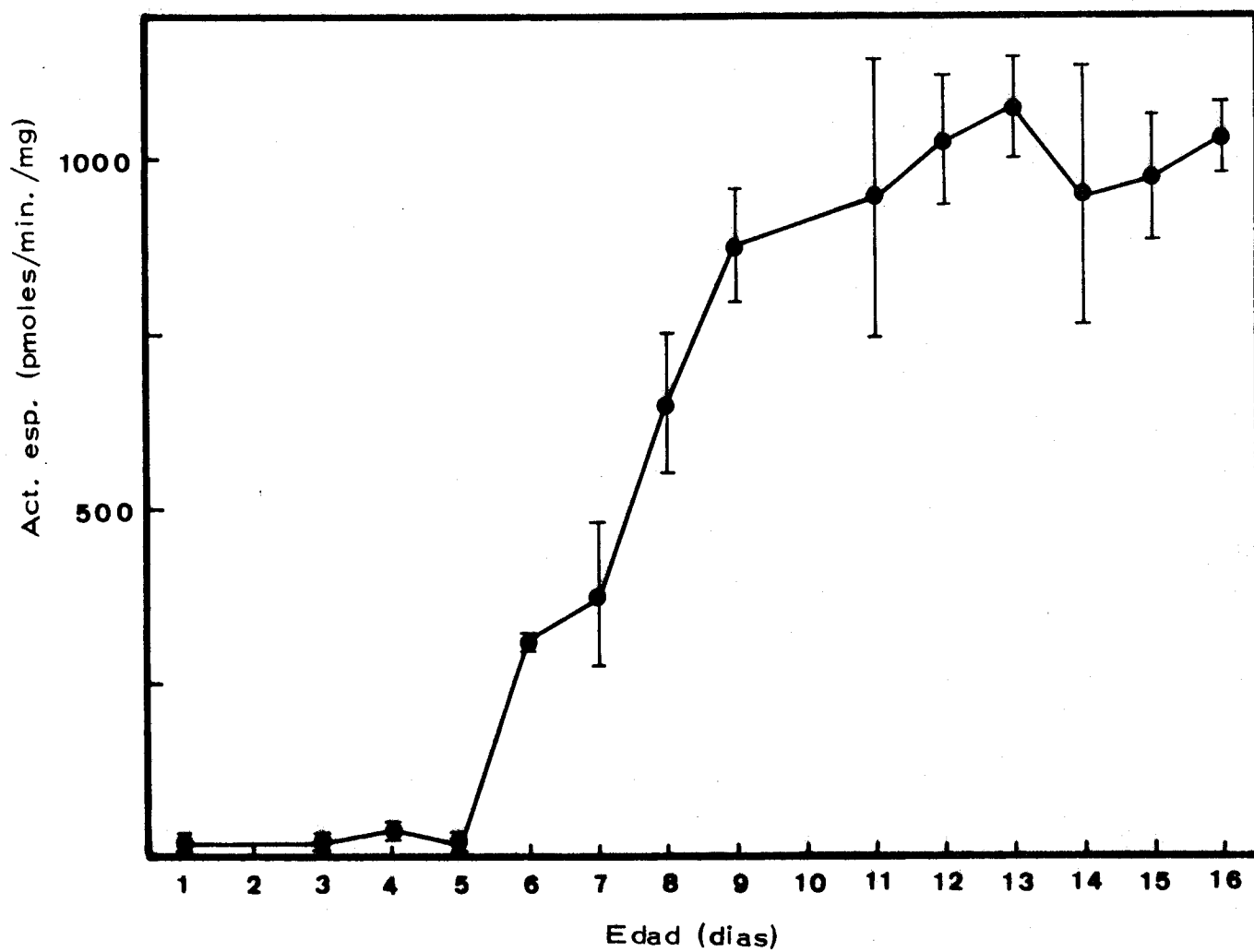
Los animales eran sacrificados siempre una o dos horas después de encenderse la luz en la habitación donde se encontraban.

4. B. 1. 1. - Actividad en hígado.

Se ha determinado la actividad reductasa de hígado en animales de 1 a 16 días de edad.

Los resultados se exponen en la tabla XV (fig. 15), observándose una actividad prácticamente nula hasta el día cinco a partir del cual comienza a incrementarse bruscamente, estabilizándose aproximadamente hacia los días nueve-diez y manteniéndose los niveles de actividad con li-

FIGURA 15



Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado durante el desarrollo postnatal.

geras variaciones hasta el último día estudiado.

4.B.1.2. - Actividad en cerebro

Como en el caso anterior, estudiamos las variaciones en este órgano de la HMG-CoA reductasa desde el día 1 al 16, observándose como se muestra en la tabla XVI (fig. 16), que la actividad no presenta variaciones considerables manteniéndose dentro de unos márgenes limitados a lo largo de los días estudiados, y en niveles inferiores a los alcanzados en hígado a partir de los 7-8 días.

4.B.1.3. - Actividad en asa duodenal

La actividad reductasa determinada en este tejido, del día 1 al 14, (tabla XVII y fig. 17) da unos resultados un tanto variables. Así, la actividad aumenta desde el primer día hasta el siete manteniéndose el nivel hasta el día once, a partir del cual decrece la actividad. En cualquier caso, la actividad HMG-CoA reductasa de asa duodenal es muy inferior a la existente en cerebro o en hígado.

4.B.2. - Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta.

Se sabe que el colesterol es un inhibidor feed-back de su propia síntesis actuando especialmente sobre el HMG-CoA reductasa. Las siguientes experiencias muestran el efecto del colesterol, suministrado por la dieta desde el nacimiento, sobre la actividad reductasa, en los tres tejidos estudiados.

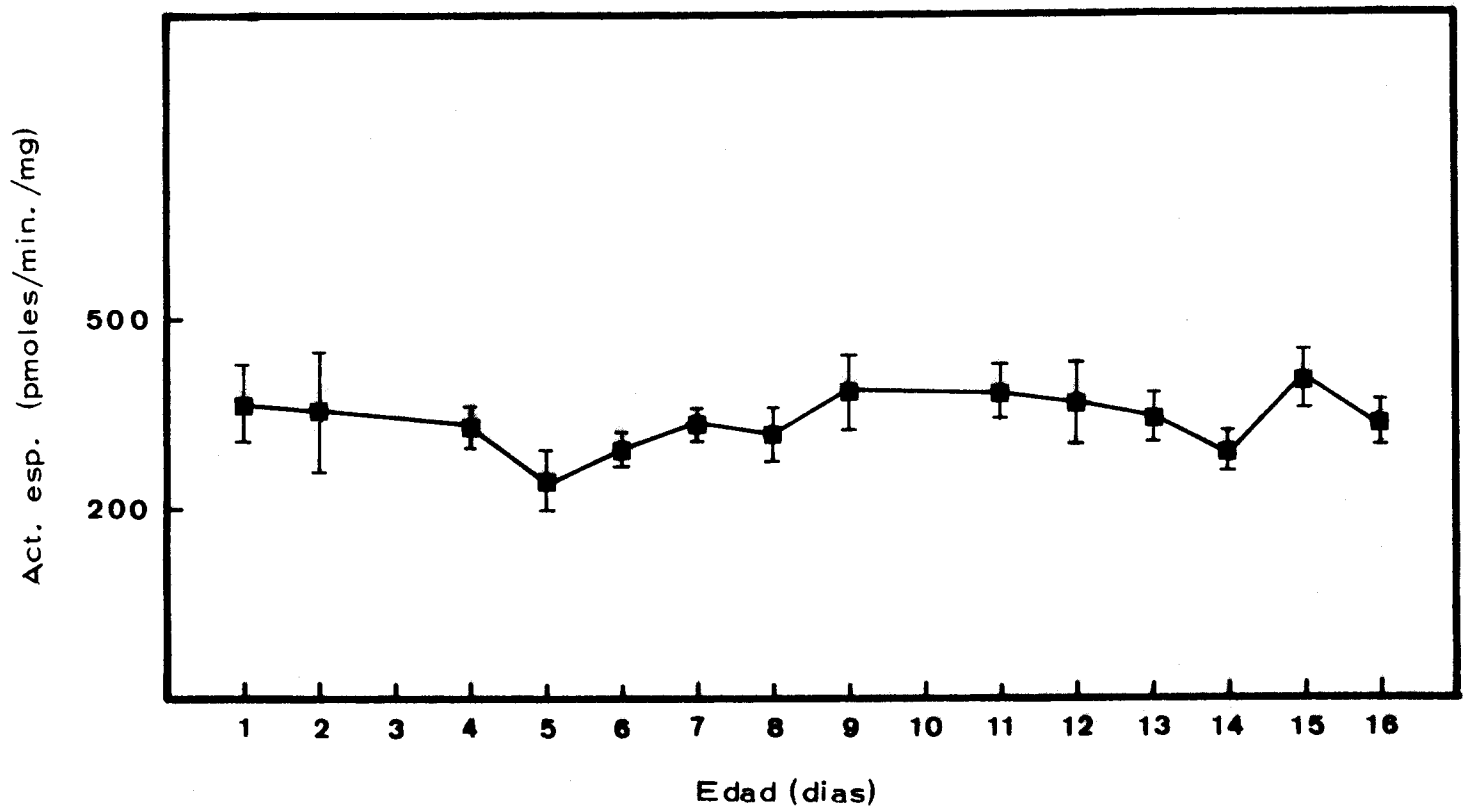
Hay que decir en este caso que, por motivos del diseño experimental, los animales se sacrificaron a la hora que se iluminaba la habitación donde se hallaban.

TABLA XVI

Influencia de la edad sobre la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas en cerebro de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (dias)	Act. esp. (pmoles/min/mg)	Edad (dias)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
1	388,6 \pm 51.0	9	405.6 \pm 51.7
2	381,4 \pm 83,4	11	299.2 \pm 35.5
4	358.3 \pm 15.9	12	393.1 \pm 54.8
5	284,4 \pm 39.0	13	372.5 \pm 28.8
6	335.0 \pm 19.0	14	319.5 \pm 24.7
7	365.4 \pm 18.7	15	418.2 \pm 29.8
8	347.5 \pm 31.4	16	358.3 \pm 14.1

FIGURA 16



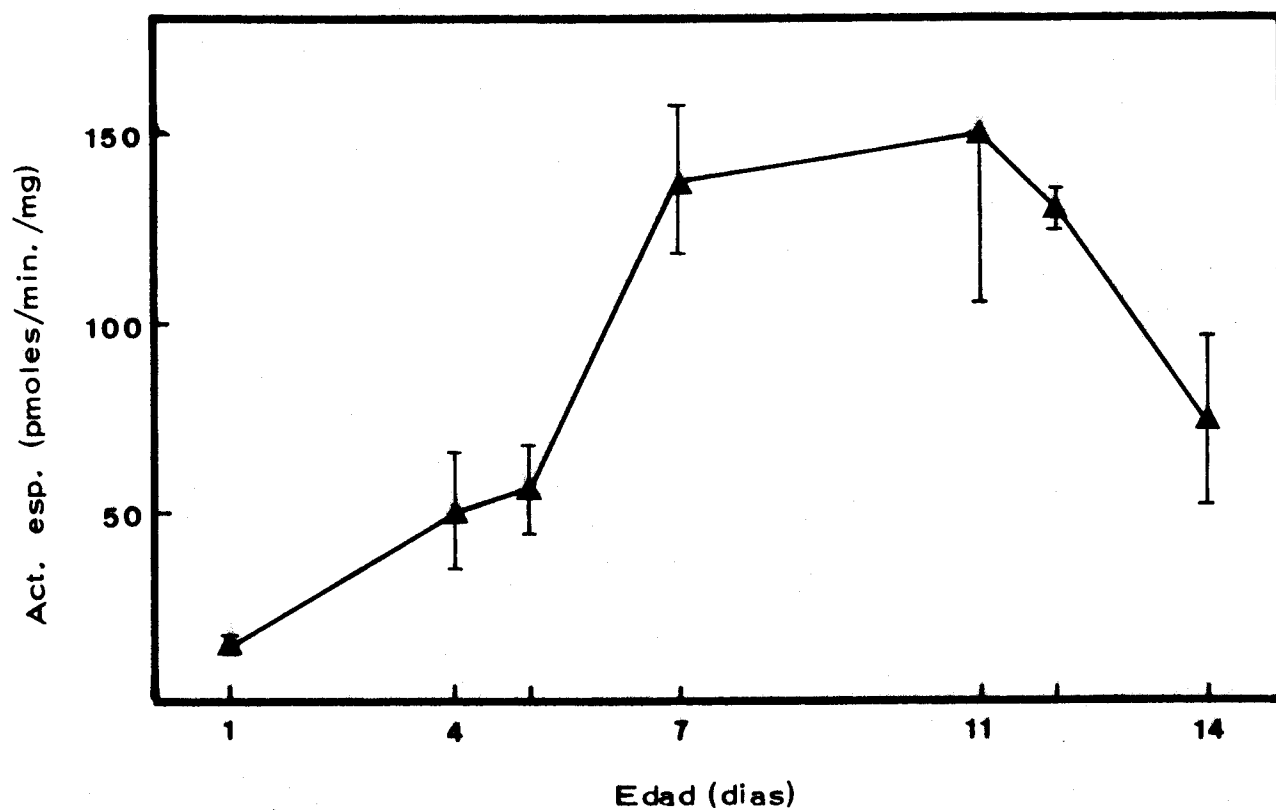
Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de cerebro durante el periodo postnatal.

TABLA XVII

Influencia de la edad sobre la actividad HM-CoA reductasa de microsomas de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (dias)	Act. esp. (pmoles/min/mg)
1	15.3 \pm 0.5
4	50.6 \pm 15.2
5	55.9 \pm 12.4
7	137.9 \pm 19.5
11	149.4 \pm 47.8
12	129.9 \pm 4.2
14	73.2 \pm 27.3

FIGURA 17



Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de asa
duodenal de pollo, durante el desarrollo postnatal.

4.B.2.1. - Actividad en hígado

Se ha determinado la actividad reductasa en los días que siguen al nacimiento, en pollos de camadas iguales donde unos eran alimentados con dieta estandar (controles) y a otros se le añadía en la dieta colesterol al 2 %, siendo este su alimento hasta el último día determinado.

Los resultados se muestran en la tabla XVIII (fig. 18) donde puede verse que la actividad reductasa en pollos con dieta de colesterol, desde el principio muestran una casi total inhibición. Esta inhibición es particularmente acusada a partir del día siete en adelante en que la actividad queda reducida en un 2-4% de la actividad control.

4.B.2.2. - Actividad en cerebro

El planteamiento de las experiencias fué igual que en el caso del hígado. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XIX y fig. 19. A diferencia del hígado, la dieta rica en colesterol no muestra un efecto apreciable sobre la actividad reductasa en ninguno de los días estudiados.

4.B.2.3. - Actividad en asa duodenal

Para estudiar el efecto del colesterol suministrado en la dieta sobre la reductasa en asa duodenal, se han utilizado experiencias de la misma forma que en los tejidos anteriores.

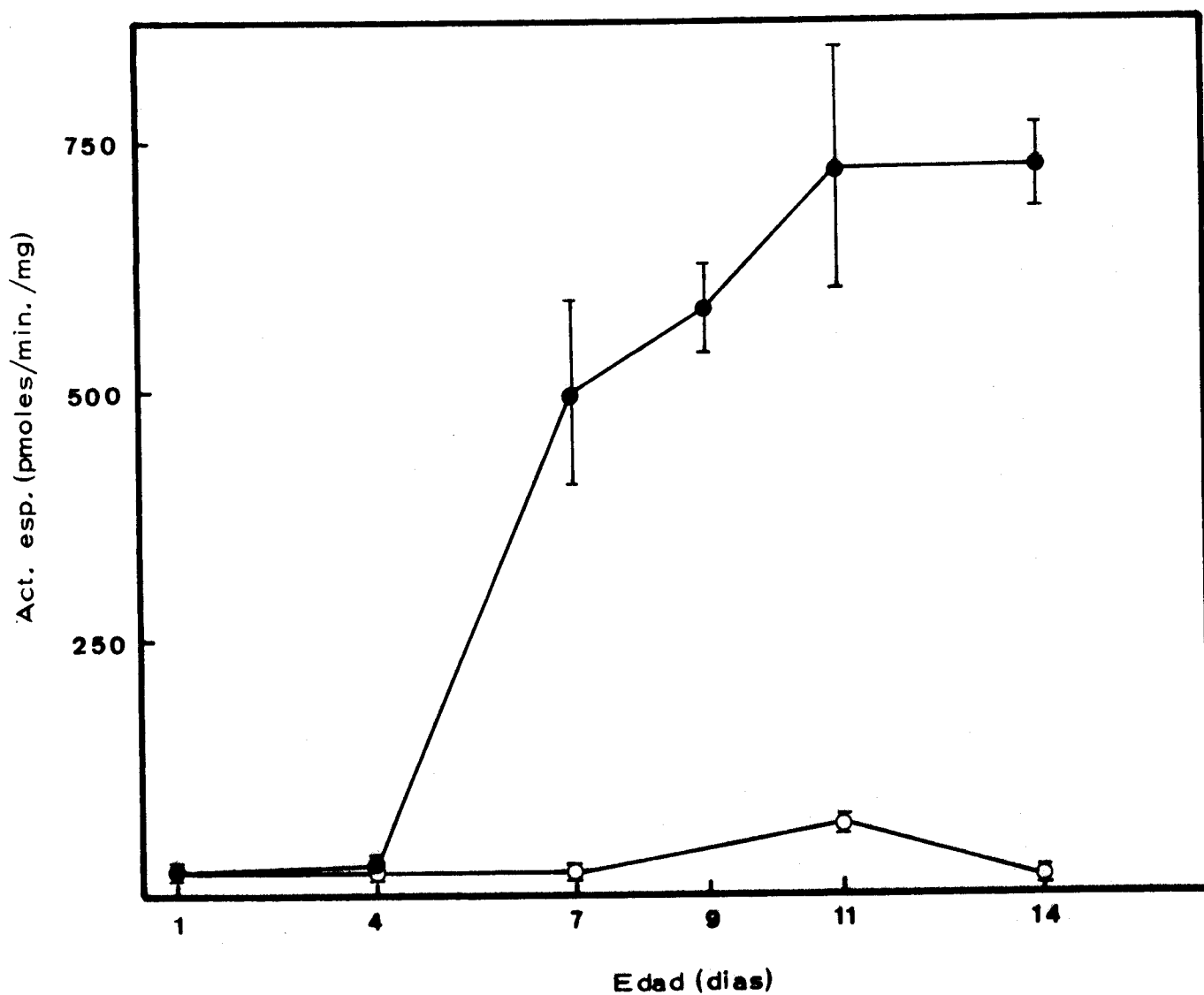
En este caso, la actividad reductasa en pollos con dieta rica en colesterol, se inhibe ya al cuarto día, manteniéndose el resto de los días estudiados alrededor de un 15-20 % de la actividad control. Los resultados se muestran en la tabla XX y fig. 20.

TABLA XVIII

Influencia de la suplementación de colesterol al 2 % de la dieta sobre la actividad HMG-CoA reductasa microsomal de hígado de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (días)	Act. esp. (pmoles/min/mg)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
1	23.9 \pm 1.7	-----
4	30.1 \pm 2.0	28.1 \pm 6.4
7	498.0 \pm 96.6	21.4 \pm 2.0
9	583.7 \pm 42.1	51.9 \pm 21.9
11	722.2 \pm 121.7	70.3 \pm 14.5
14	723.7 \pm 39.8	18.0 \pm 1.5

FIGURA 18



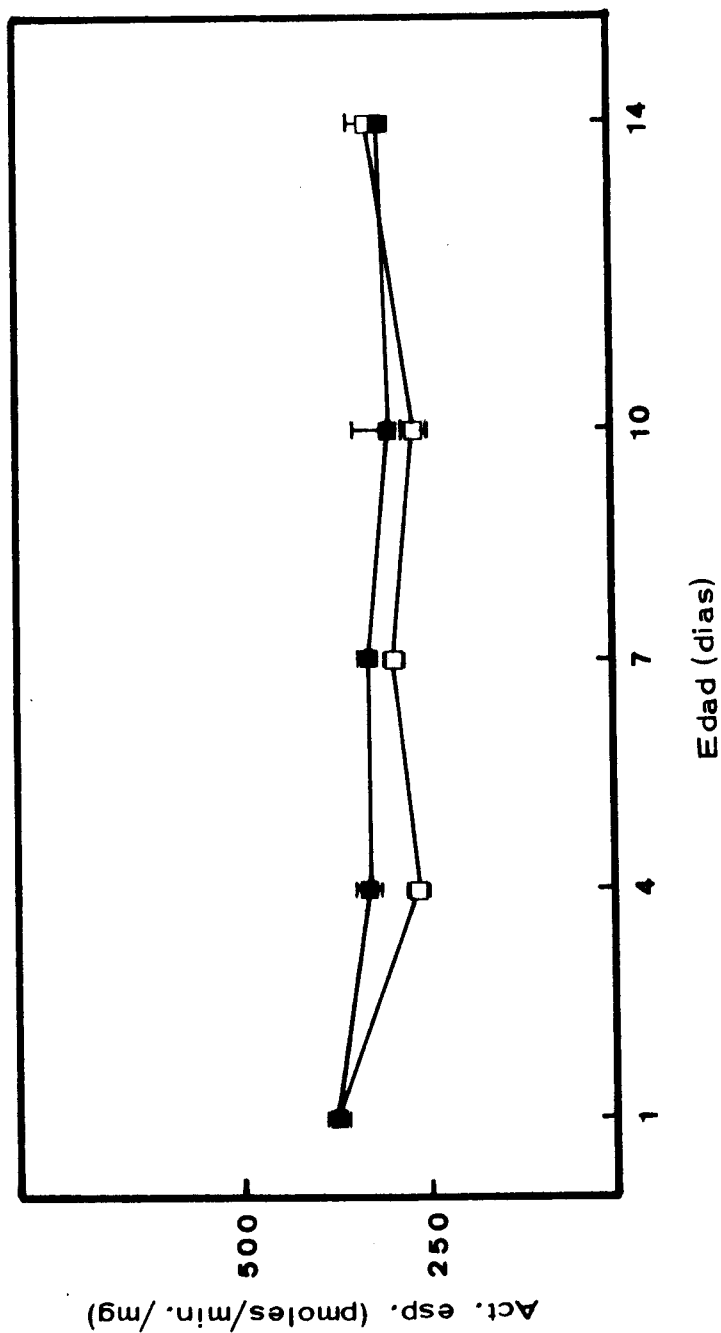
Influencia del colesterol sobre las variaciones de la HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado a lo largo de la edad. (●) Actividad reductasa en pollos con dieta estandar (○) Actividad reductasa en pollos con dieta suplementada con colesterol al 2%

TABLA XIX

Influencia de la suplementación de colesterol al 2 % a la dieta sobre la actividad HMG-CoA reductasa microsomal de cerebro de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (días)	Act. esp. (pmoles/min/mg)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
1	381.4 \pm 8.3	-----
4	332.4 \pm 8.8	264.9 \pm 8.7
7	326.6 \pm 3.9	300.5 \pm 18.4
10	296.5 \pm 49.5	267.8 \pm 9.0
14	311.0 \pm 24.4	325.9 \pm 6.4

FIGURA 19



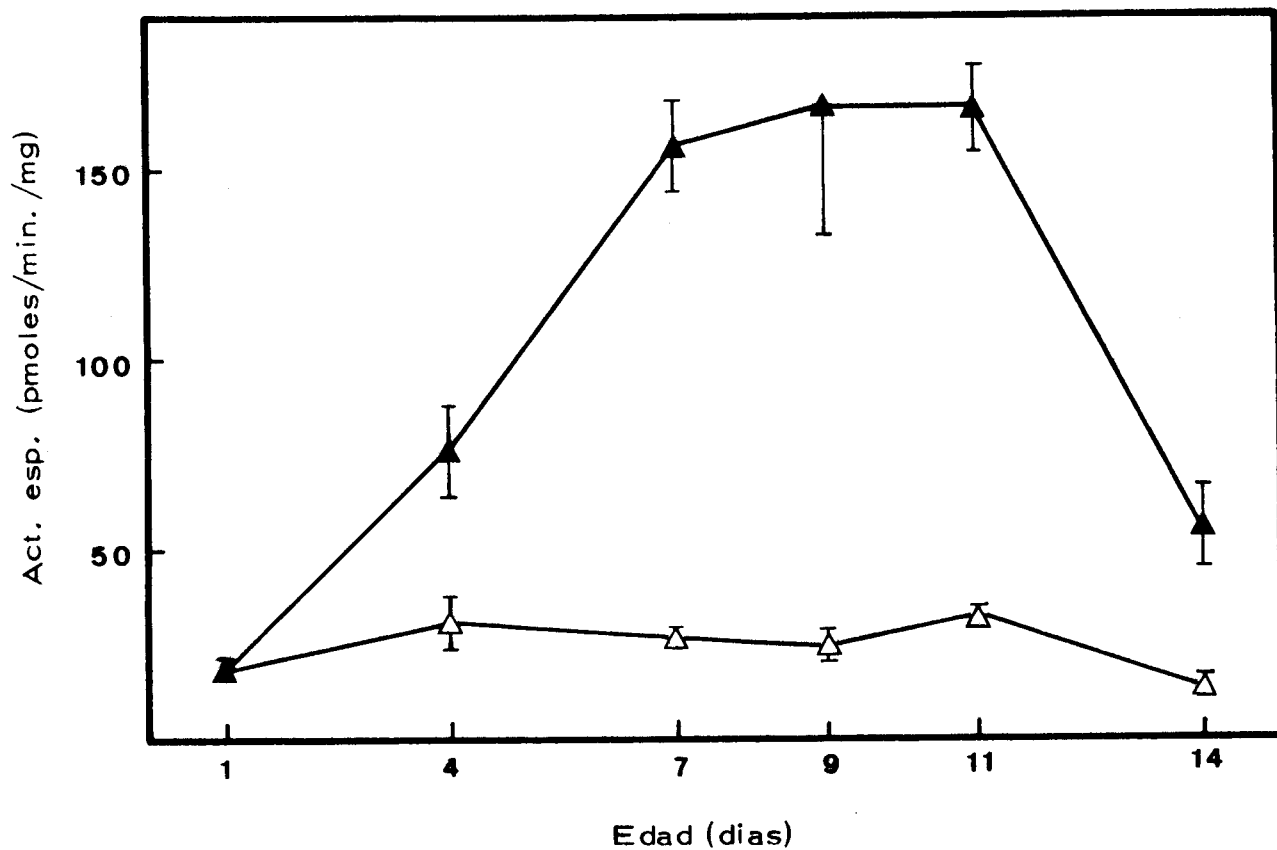
Influencia del colesterol sobre las variaciones de HMG-CoA reductasa de microsomas de cerebro a lo largo de la edad. (■) Actividad reductasa en pollos con dieta estandar. (□) Actividad reductasa en pollos con dieta suplementada con colesterol al 2 %.

TABLA XX

Influencia de la suplementación de colesterol al 2 % a la dieta sobre la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de asa duodenal de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (días)	Act. esp. (pmoles/min/mg)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
1	18.1 \pm 3.1	-----
4	77.3 \pm 11.7	31.4 \pm 5.3
7	157.5 \pm 11.5	27.1 \pm 1.6
9	167.1 \pm 34.4	25.0 \pm 3.4
11	166.4 \pm 12.4	33.0 \pm 4.3
14	53.7 \pm 11.6	14.1 \pm 2

FIGURA 20



Influencia del colesterol sobre las variaciones de la HMG-CoA reductasa de microsomas de asa duodenal a lo largo de la edad. (▲), Actividad reductasa en pollos con dieta estandar. (△), Actividad reductasa en pollos con dieta suplementada con colesterol al 2 %.



4.C.- INCORPORACION DE ^{14}C -ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES.

Para poder ver la importancia de la reductasa en la biosíntesis de colesterol se estudió esta ruta biosintética incorporando acetato marcado y determinando los lípidos insaponificables formados.

En este caso, solo se estudió en dos tejidos, hígado y asa duodenal. El no trabajar con cerebro se debió a la dificultad que presentaba la obtención de preparaciones de este tejido en estas experiencias.

4.C.1.- Establecimiento de las condiciones óptimas

4.C.1.1.- Influencia del peso de tejido utilizado

Según algunos autores el grosor de los cortes y peso de tejido utilizado en la incorporación influía grandemente en los resultados. Por este motivo, se diseñaron experiencias, donde se incubaron cortes de hígado de distinto grosor con acetato marcado durante una hora. Los resultados se expresan en la tabla XXI y fig. 21, de donde se deduce que los cortes óptimos son los delgados y el peso a incubar, de 50-100 mg.

Esto mismo se determinó en asa duodenal donde se utilizó la primera porción de la misma cortándose en pequeños trozos y colocándolos en matraces de incubación en cantidades distintas. En los resultados que se muestran en la tabla XXII y fig. 22 podemos apreciar una linealidad entre la incorporación y el peso de tejido, hasta los 100 mg.

TABLA XXI

Efecto del peso de tejido utilizado sobre la incorporación de ¹⁴C-acetato en cortes de hígado.

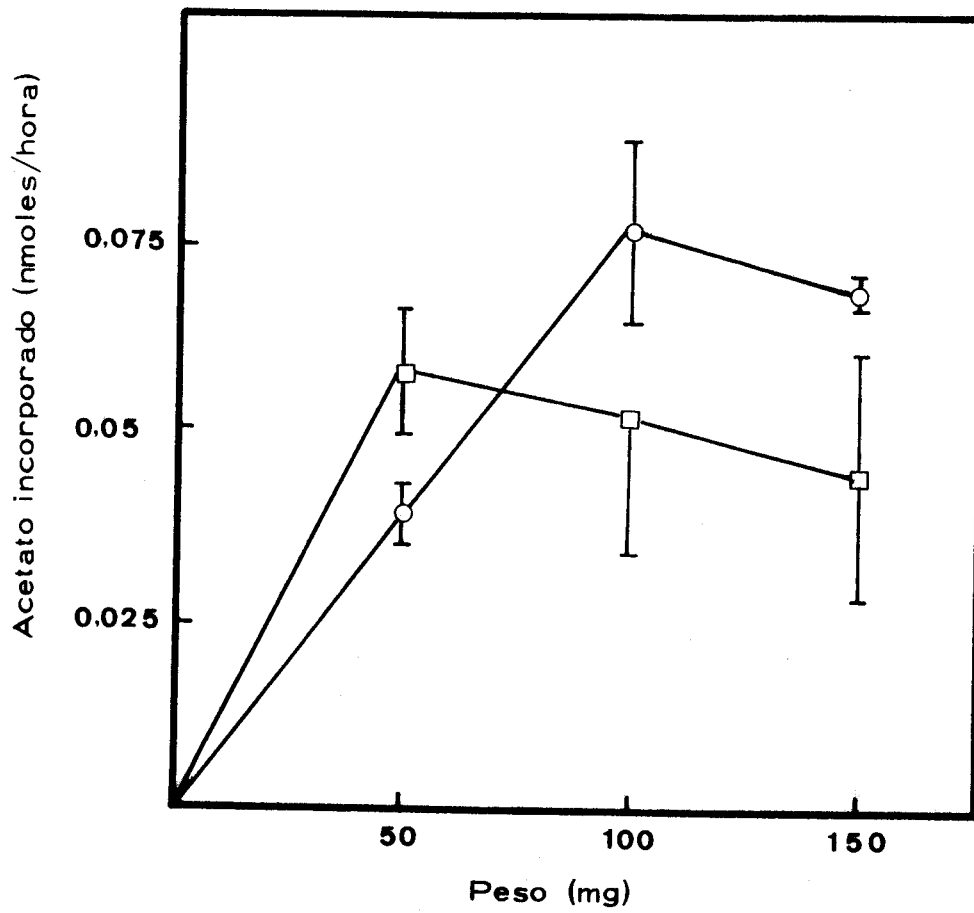
Peso (mg)	Acetato incorporado (nmoles / h)	
	Cortes gruesos	Cortes delgados
50	0.059 ± 0.008	0.041 ± 0.003
100	0.053 ± 0.017	0.077 ± 0.012
150	0.045 ± 0.016	0.068 ± 0.001

TABLA XXII

Efecto del peso de tejido utilizado sobre la incorporación de ¹⁴C-acetato en fragmentos de asa duodenal.

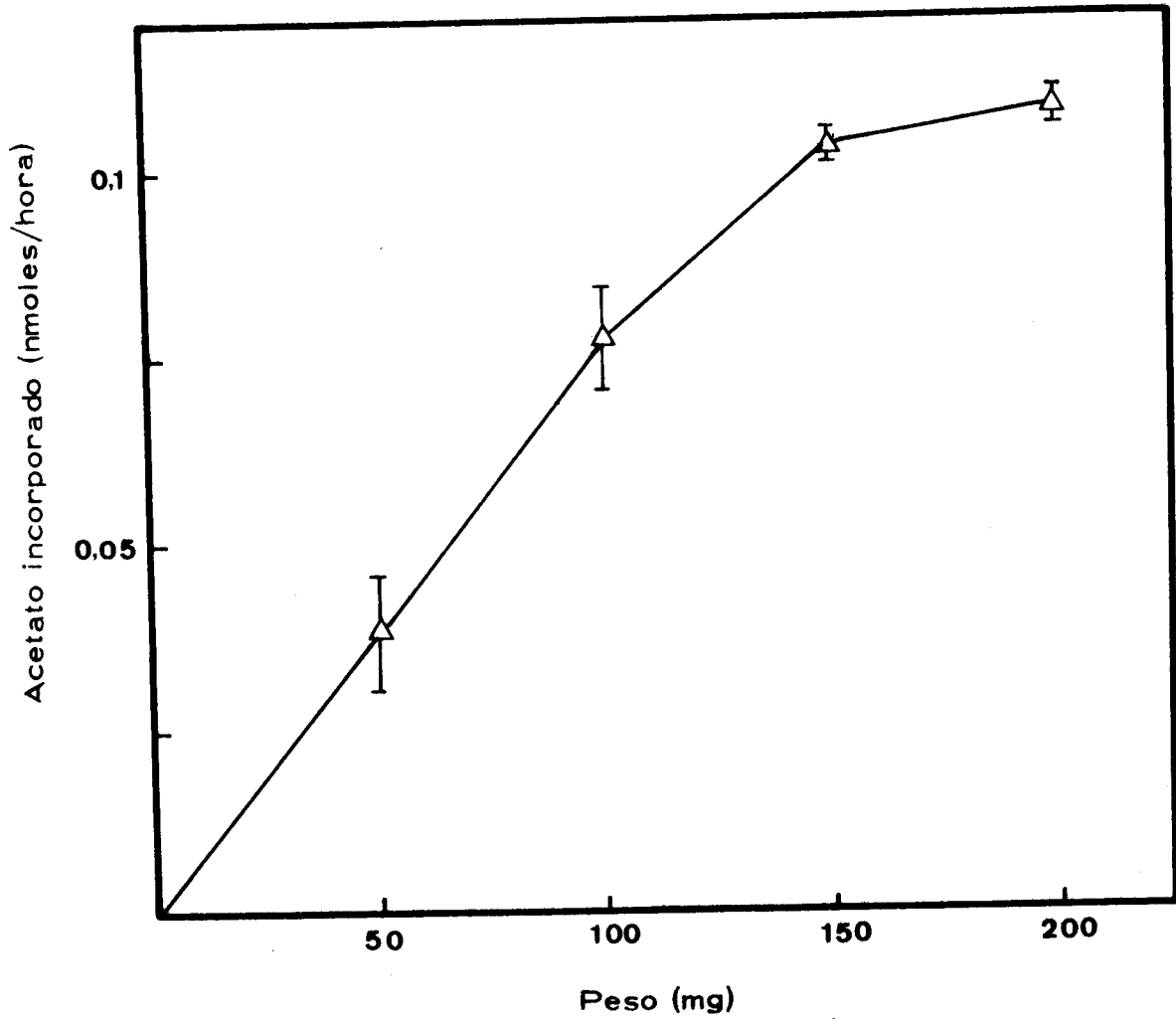
Peso (mg)	Acetato incorporado (nmoles / h)
50	0.038 ± 0.008
100	0.077 ± 0.007
150	0.103 ± 0.002
200	0.108 ± 0.002

FIGURA 21



Influencia del peso de tejido utilizado sobre la incorporación de ¹⁴C-acetato por cortes de hígado (○), Cortes delgados; (□), cortes gruesos.

FIGURA 22



Influencia del peso de tejido utilizado sobre la incorporación de ^{14}C -acetato por fragmentos de asa duodenal.

4.C.1.2.- Influencia del tiempo de incubación

Con objeto de determinar el tiempo óptimo de la incorporación de ^{14}C -acetato se hicieron experiencias incubando cortes de hígado durante diferentes tiempos en un intervalo de 0-20 minutos.

Los resultados se muestran en la tabla XXIII fig. 23 donde podemos observar que existe linealidad en el intervalo de tiempo estudiado.

4.C.2.- Variaciones a lo largo del desarrollo postnatal. Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta

Se trataba de estudiar la ruta biosintética del colesterol bajo las mismas condiciones en que se había determinado el HMG-CoA reductasa.

En estas experiencias los pollos eran sacrificados en el momento que se iluminaba la habitación donde estaban las jaulas.

4.C.2.1.- Hígado

La incorporación de ^{14}C -Acetato se llevo a cabo en cortes de tejido procedentes de animales controles sometidos a una dieta estandar y de la misma forma, en pollos sometidos desde el principio a una alimentación suplementada con colesterol al 2 %.

TABLA XXIII

Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de ^{14}C -acetato por cortes de hígado.

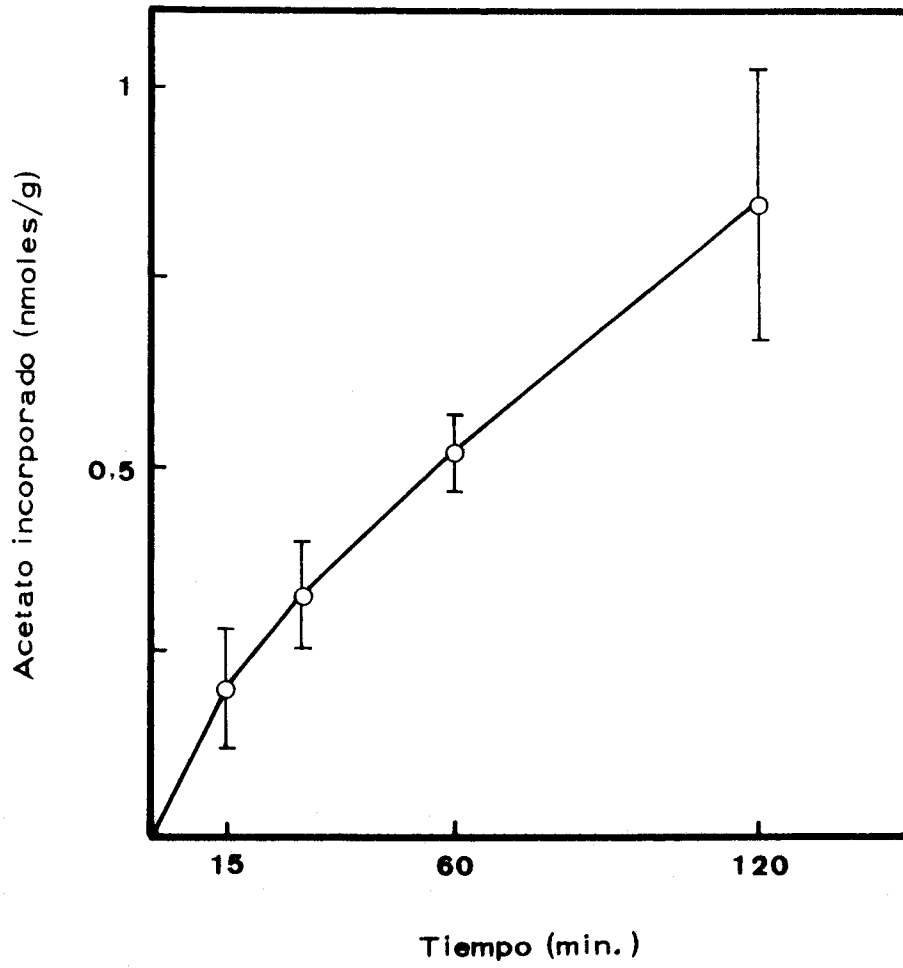
Tiempo (min)	Acetato incorporado (nmoles / g tejido)
15	0.200 \pm 0.088
30	0.325 \pm 0.075
60	0.515 \pm 0.055
120	0.840 \pm 0.180

TABLA XXIV

Influencia de la edad y de la suplementación de colesterol a la dieta ^{14}C -acetato por cortes de hígado de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad (días)	Acetato incorporación (nmoles / g / h)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
4	0.155 \pm 0.009	0.170 \pm 0.005
7	0.452 \pm 0.001	0.642 \pm 0.742
11	1.475 \pm 0.061	0.115 \pm 0.002
14	1.497 \pm 0.036	0.182 \pm 0.021

FIGURA 23



Influencia del tiempo de incubación sobre la incorporación de ^{14}C -acetato por cortes de hígado.

Los resultados, expresados en la tabla XXIV (fig. 24), ponen de manifiesto que la incorporación de acetato en animales controles sigue un esquema semejante al obtenido en la evolución de la actividad HMG-CoA reductasa a lo largo del desarrollo postnatal.

En el caso de una dieta suplementada con colesterol, la incorporación sigue el mismo patrón que los controles hasta el día siete, bajando bruscamente y manteniendo un nivel basal en los días sucesivos.

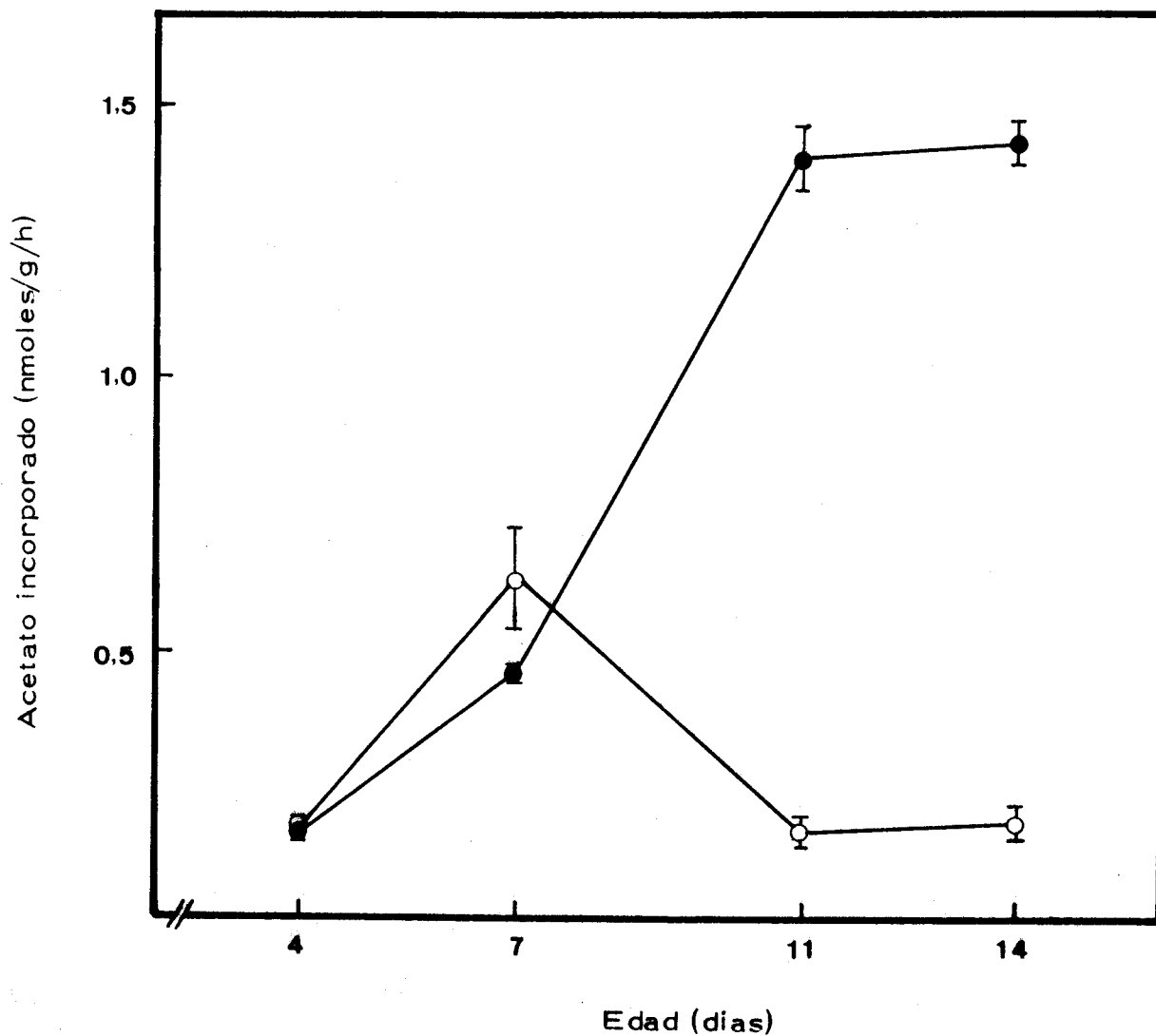
4.C.2.2. - Asa duodenal

Las experiencias se diseñaron de la misma forma que en hígado: incubándose trozos de asa duodenal procedentes de pollos controles y pollos con dieta rica en colesterol.

Los resultados muestran también un esquema semejante a la evolución de la actividad HMG-CoA reductasa (tabla XXV, fig. 25) con un máximo de incorporación hacia el día siete.

La suplementación de colesterol a la dieta disminuye apreciablemente la incorporación de acetato, si bien en este tejido la forma de la evolución es semejante a la obtenida en animales controles.

FIGURA 24



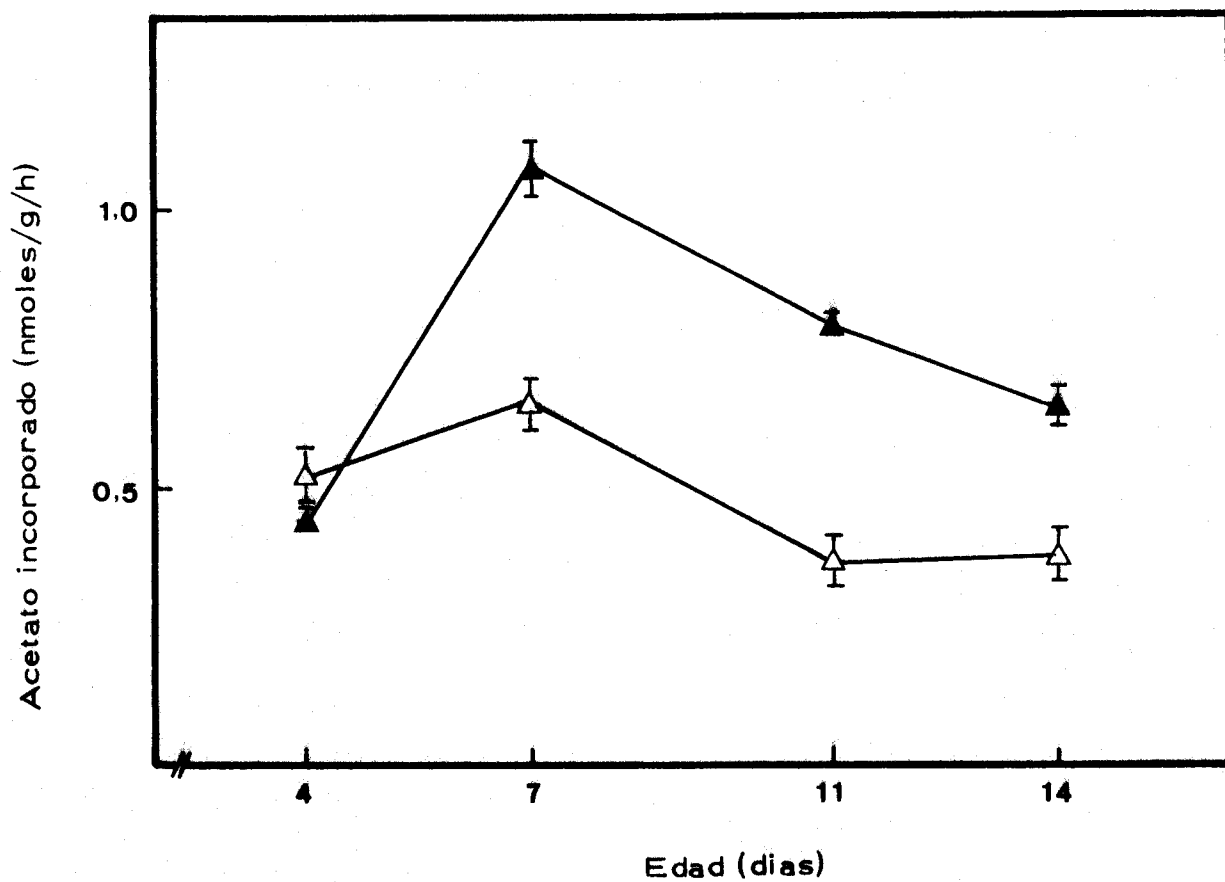
Incorporación de ^{14}C -acetato por cortes de hígado de pollo a lo largo del desarrollo postnatal. Efecto de la suplementación de colesterol al 2 % a la dieta. (●) animales controles; (○) animales con dieta rica en colesterol.

TABLA XXV

Influencia de la edad y de la suplementación de colesterol a la dieta ^{14}C -acetato por fragmentos de asa duodenal de pollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones. El \pm representa el error estandar de la media.

Edad (días)	Acetato incorporación (nmoles / g / h)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
4	0.429 \pm 0.008	0.502 \pm 0.054
7	1.088 \pm 0.047	0.654 \pm 0.055
11	0.795 \pm 0.017	0.359 \pm 0.050
14	0.618 \pm 0.037	0.385 \pm 0.072

FIGURA 25



Incorporación de ¹⁴C-acetato por fragmentos de asas duodenal a lo largo del desarrollo postnatal. Efecto de la suplementación de colesterol al 2 % a la dieta. (▲), Animales controles; (△), animales con dieta rica en colesterol.

4. D. - VARIACIONES EN LA CANTIDAD DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS DE LOS MICROSOMAS EN FUNCION DE LA EDAD.

El hecho de ser la HMG-CoA reductasa una enzima ligada a la membrana microsomal, nos hizo pensar que al variar los componentes de la membrana, se podía actuar de alguna manera sobre la enzima, modificando su actividad.

4. D. 1. - Microsomas de hígado.

Se ha estudiado la composición lipídica de microsomas hepáticos en condiciones normales a lo largo del desarrollo postnatal y en condiciones de una dieta continuada de colesterol al 2 %.

Se trataba de ver si las variaciones bruscas que aparecían en la HMG-CoA reductasa a lo largo de la edad tenían paralelismo con cambios en alguno o varios de los compuestos lipídicos de la membrana. Así, se estudiaron una serie de componentes que detallamos a continuación.

4. D. 1. 1. - Colesterol total, libre y esterificado

Hemos determinado la cantidad de colesterol total, libre y esterificado en microsomas de hígado, durante las dos primeras semanas que siguen a la eclosión, en condiciones de dieta normal, y dieta con colesterol al 2 %.

En la tabla XXVI (fig. 26), podemos apreciar como el contenido de colesterol total en microsomas hepáticos de animales controles sufre una ligera disminución en los primeros días, manteniéndose ese nivel el resto del tiempo. Por el contrario, en pollos alimentados con dieta rica en colesterol, este aumenta en la membrana microsomal, alcanzando un ligero máximo en el cuarto día y manteniéndose siempre por encima de los niveles observados en los animales controles.

En cuanto al colesterol libre y esterificado (tabla XXVI, fig. 27), en microsomas de pollos controles siempre hay un mayor porcentaje de libre que de esterificado. La suplementación de colesterol a la dieta hace que estos porcentajes tiendan a igualarse, especialmente a partir del día siete.

4. D. 1. 2. - Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol

Utilizando un lote de pollos controles sometidos a una dieta estandar y otro de pollos alimentados con dieta de colesterol al 2 % se determinó el contenido total de fósforo en membranas microsomales de hígado junto con los distintos fosfolípidos presentes.

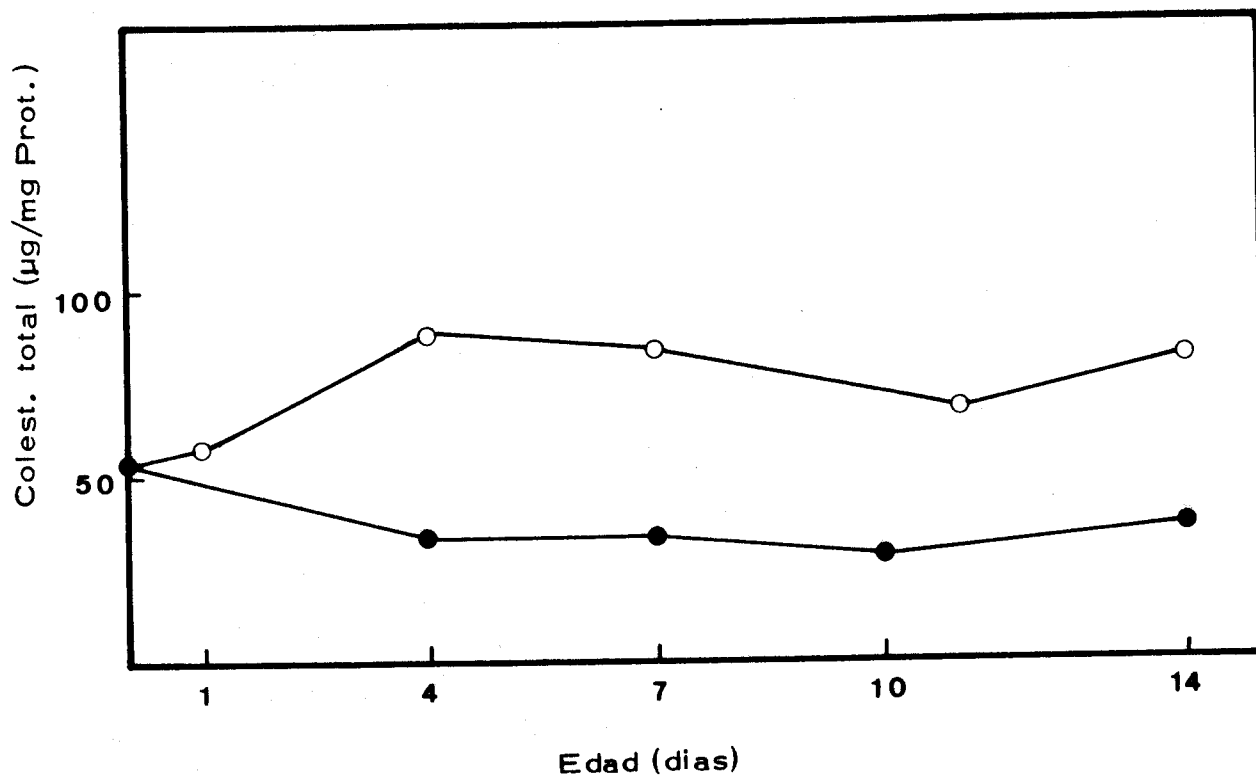
Los resultados de la tabla XXVII y fig. 28, muestran el contenido de fósforo total no apreciándose apenas variaciones entre pollos controles y pollos con dieta rica en colesterol. Las variaciones de fósforo microsomal a lo largo de la edad en microsomas de hígado de pollos controles no son muy grandes, observándose una disminución en los primeros días incrementándose luego hasta igualar el valor del día cero.

TABLA XXVI

Contenido en colesterol total, libre y esterificado de los microsomas de hígado durante el periodo postnatal, en pollos con dieta estandar y pollos con dieta con colesterol al 2 %.

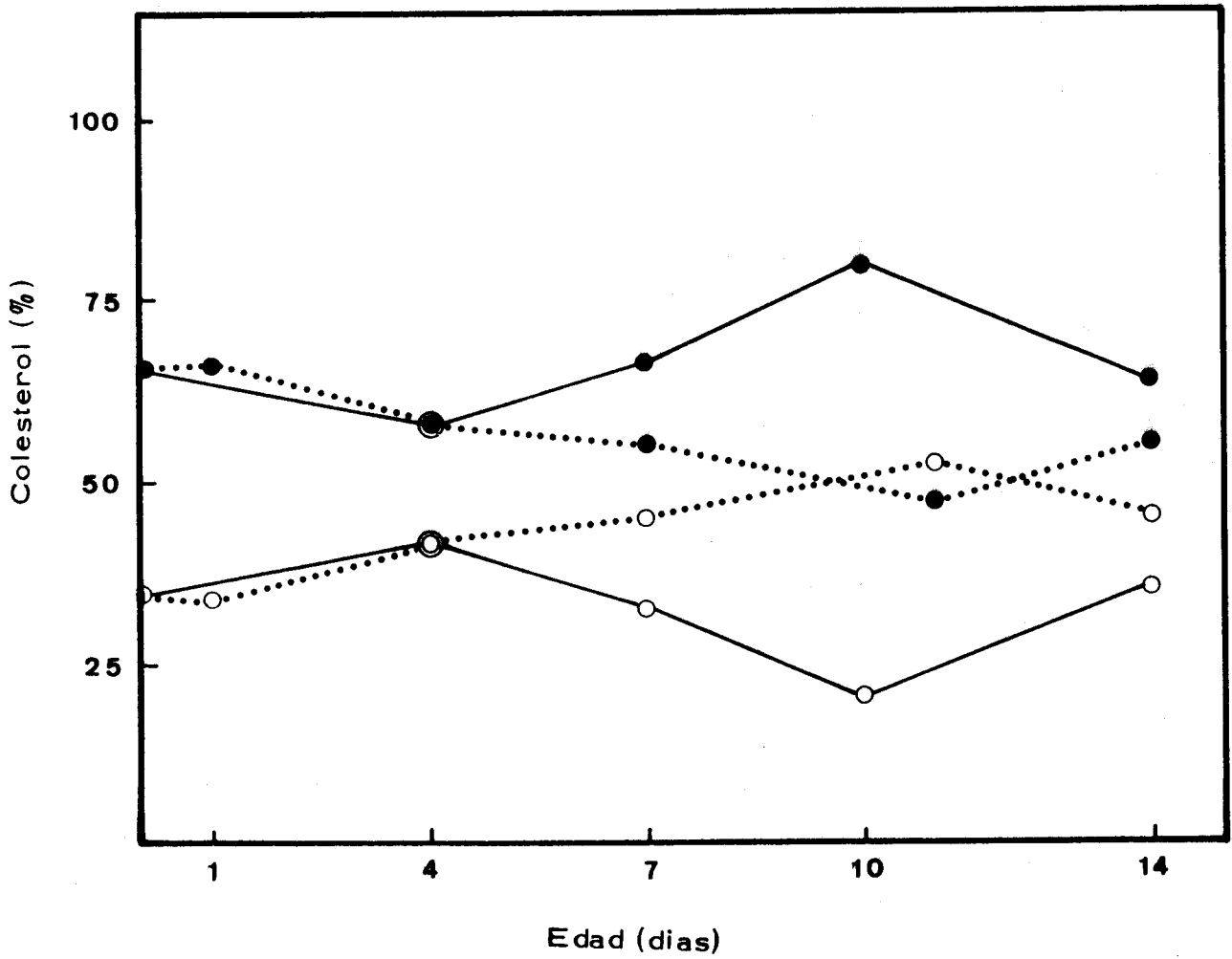
Edad (días)	<u>µg colest/mg prot.</u>		<u>Dieta estandar</u>				<u>Dieta + colesterol</u>				<u>Col total</u>	<u>Col. incorporado</u>	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol	Libre		Esterificado		Libre		Esterificado		Incorporado µg/mg	Libre µg/mg	Esterificado µg/mg
			µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%			
0	54.9	---	36.3	66	18.7	34	---	---	---	---	---	---	---
1	---	57.2	---	---	---	---	37.7	66	19.5	34	2.3	1.5	0.8
4	32.3	89.3	18.7	58	13.5	42	51.8	58	37.5	42	57.0	33.0	24.0
7	32.7	84.6	21.9	67	10.8	33	46.5	55	38.1	45	51.9	24.6	27.3
10	28.7	---	22.9	80	5.8	20	---	---	---	---	---	---	---
11	--	67.7	---	---	---	---	31.8	47	35.9	53	---	---	---
14	36.2	81.3	23.2	64	13.0	36	44.7	55	36.6	45	45.1	21.5	23.6

FIGURA 26



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en colesterol total de los microsomas de hígado durante las primeras semanas de vida. (●), pollos con dieta estandar; (○), pollos con dieta de colesterol al 2 %.

FIGURA 27



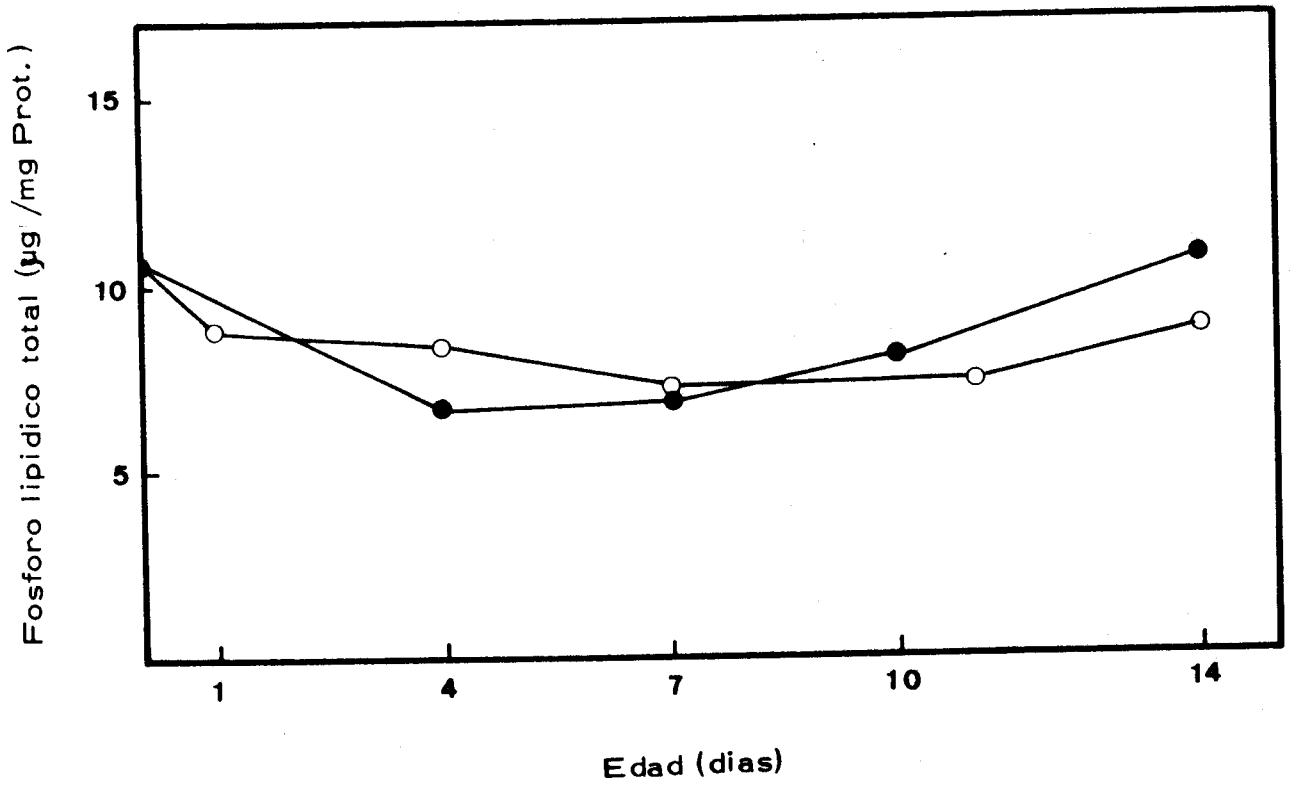
Cambios en el porcentaje de colesterol libre y esterificado de microsomas de hígado a lo largo de la edad en pollos alimentados con dieta estandar (—) y pollos alimentados con dieta rica en colesterol (...). (●) Colesterol libre; (○), colesterol esterificado.

TABLA XXVII

Influencia de la edad y de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en fosforo lipídico de los microsomas de hígado de pollo.

Edad (días)	Fosforo total (μg / mg prot.)	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
0	10.7	---
1	---	8.9
4	6.6	8.3
7	6.9	7.2
10	8.0	---
11	---	7.4
14	10.9	8.9

FIGURA 28



Variaciones en el contenido en fosforo lipídico de los microsomas de hígado de pollo a lo largo de la edad. (●), pollos con dieta estandar (○) pollos con dieta rica en colesterol.

En la tabla XXVIII (fig. 29) se expresan los μg de fósforo correspondiente a cada fosfolípido microsomal, tanto en animales controles como en pollos con dieta rica en colesterol. Los resultados indican una variación de cada fosfolípido mayoritario (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), paralela a los resultados de fósforo total.

Las variaciones de los fosfolípidos microsomales en pollos con dieta de colesterol al 2 % son en general semejantes a las correspondientes controles; tan solo la fosfatidil-etanolamina parece disminuir ligeramente a partir de 4-7 días.

Referente a los porcentajes de cada fosfolípido en las mismas circunstancias, se muestran los resultados en la tabla XXIX y fig. 30. En ellas se puede apreciar que los fosfolípidos no varían en proporción con la edad, tanto en controles como en el caso de dieta rica en colesterol. No obstante en estos últimos, la fosfatidilcolina mantiene un porcentaje superior a los controles y la fosfatidiletanolamina presenta valores por debajo de sus controles.

4.D.1.3.- Relación molar colesterol / fósforo lipídico.

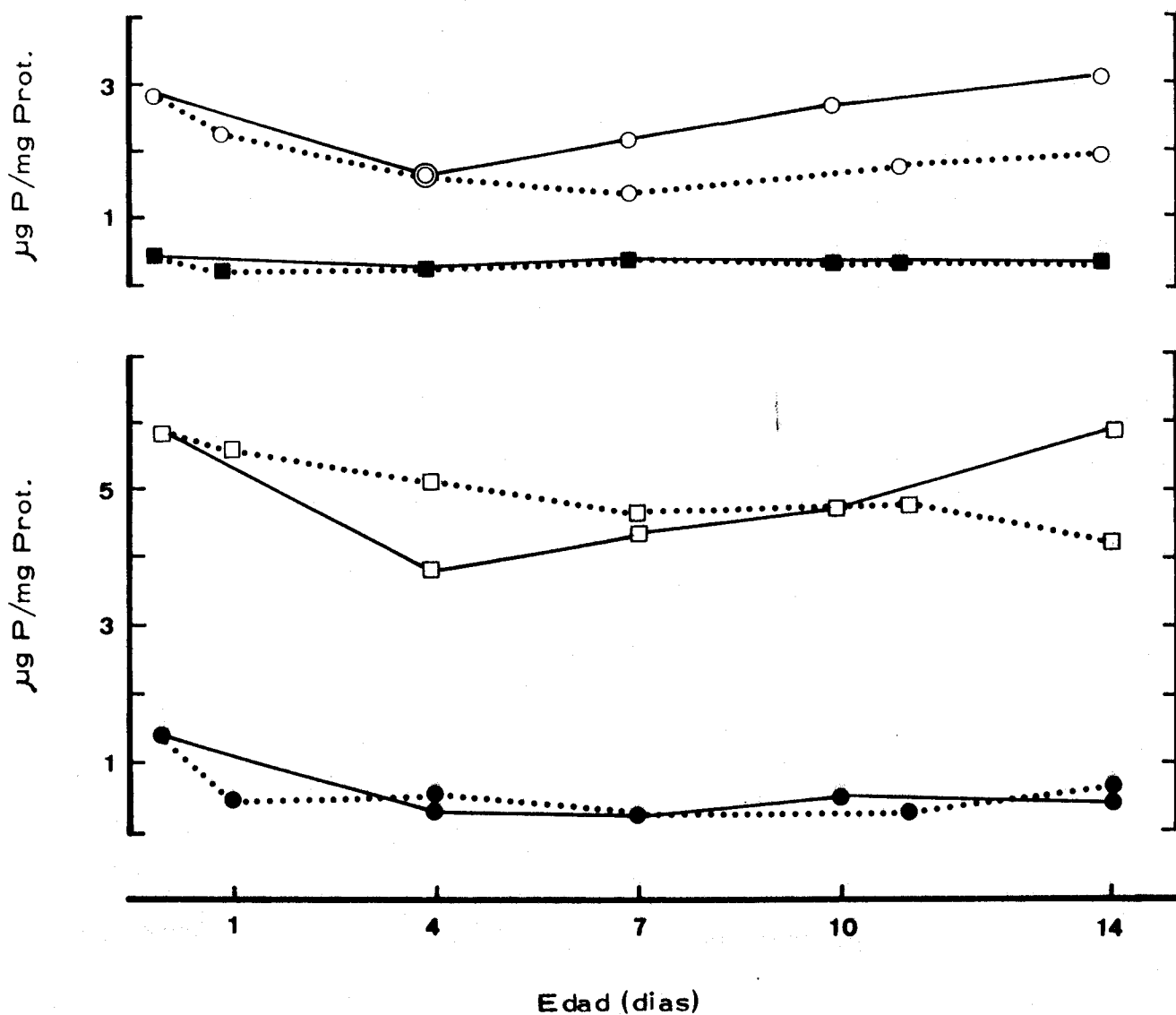
Teniendo presente que la relación molar C/P es un índice del grado de fluidez que presenta una membrana, tratamos de ver si en microsomas de hígado, esta relación varía a lo largo de la edad y también, si se alteraba por el estímulo del colesterol en la dieta. Efectivamente, esto último pudimos comprobarlo como se muestra en la tabla XXX (fig. 31), donde los resultados indican que la relación molar se incrementa desde el primer día de tratamiento dando lugar a una disminución en el grado de fluidez de estas membranas.

TABLA XXVIII

Contenido en esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina de los microsomas de hígado de pollo a lo largo del desarrollo postnatal en condiciones normales y en condiciones de dieta suplementada con colesterol al 2 %.

Edad (días)	Fosforo lipídico ($\mu\text{g P} / \text{mg prot.}$)							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	1.47	5.92	0.40	2.85	---	---	---	---
1	---	---	---	---	0.44	6.54	0.20	2.27
4	0.25	3.80	0.25	1.57	0.51	5.21	0.23	1.67
7	0.15	4.38	0.37	2.11	0.27	4.79	0.34	1.37
10	0.49	4.79	0.35	2.66	---	---	---	---
11	---	---	---	---	0.24	4.97	0.36	1.72
14	0.44	5.86	0.31	3.00	0.59	4.31	0.37	1.96

FIGURA 29



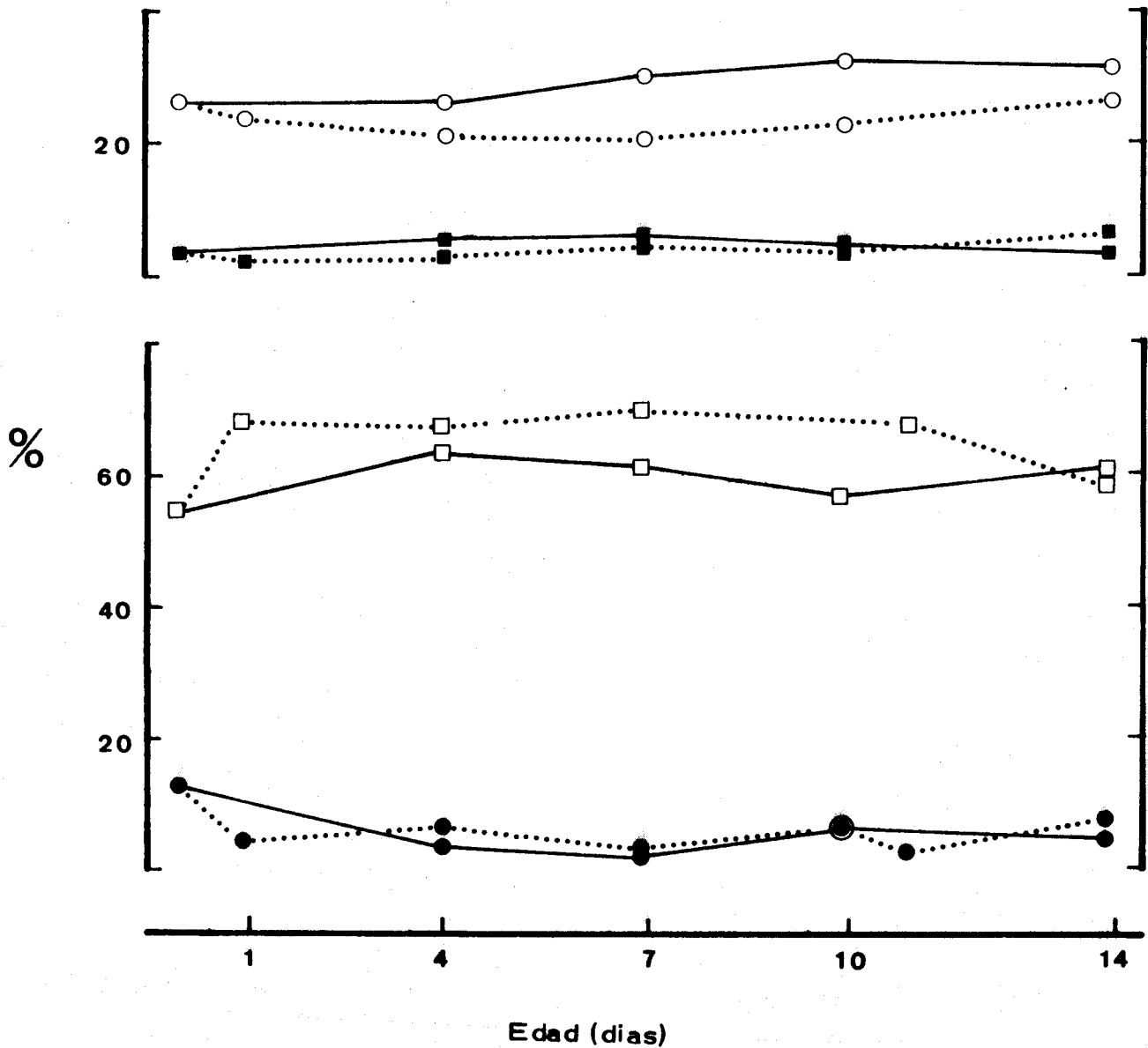
Variaciones de cada fosfolipido en los microsomas de hígado a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estandar; (.....) pollos con dieta con colesterol al 2 %. (●) Esfingomielina; (□), fosfatidilcolina; (■), fosfatidilinositol; (○), fosfatidiletanolamina.

TABLA XXIX

Influencia de la edad y de una dieta suplementada con colesterol sobre el tanto por ciento de los principales fosfolípidos de los microsomas de hígado de pollo.

Edad (días)	Fosforo lipídico (%)							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	13.8	55.5	3.7	27.0	---	---	---	---
1	---	---	---	---	4.6	69.2	2.4	24
4	4.2	64.8	4.2	26.8	6.7	68.3	3.1	21.9
7	2.2	62.4	5.4	30.0	4.0	70.7	5.1	20.2
10	6.0	57.7	4.3	32.0	---	---	---	---
11	---	---	---	---	3.3	68.2	4.9	23.6
14	4.6	60.5	3.3	31.6	8.1	59.6	5.1	27.2

FIGURA 30



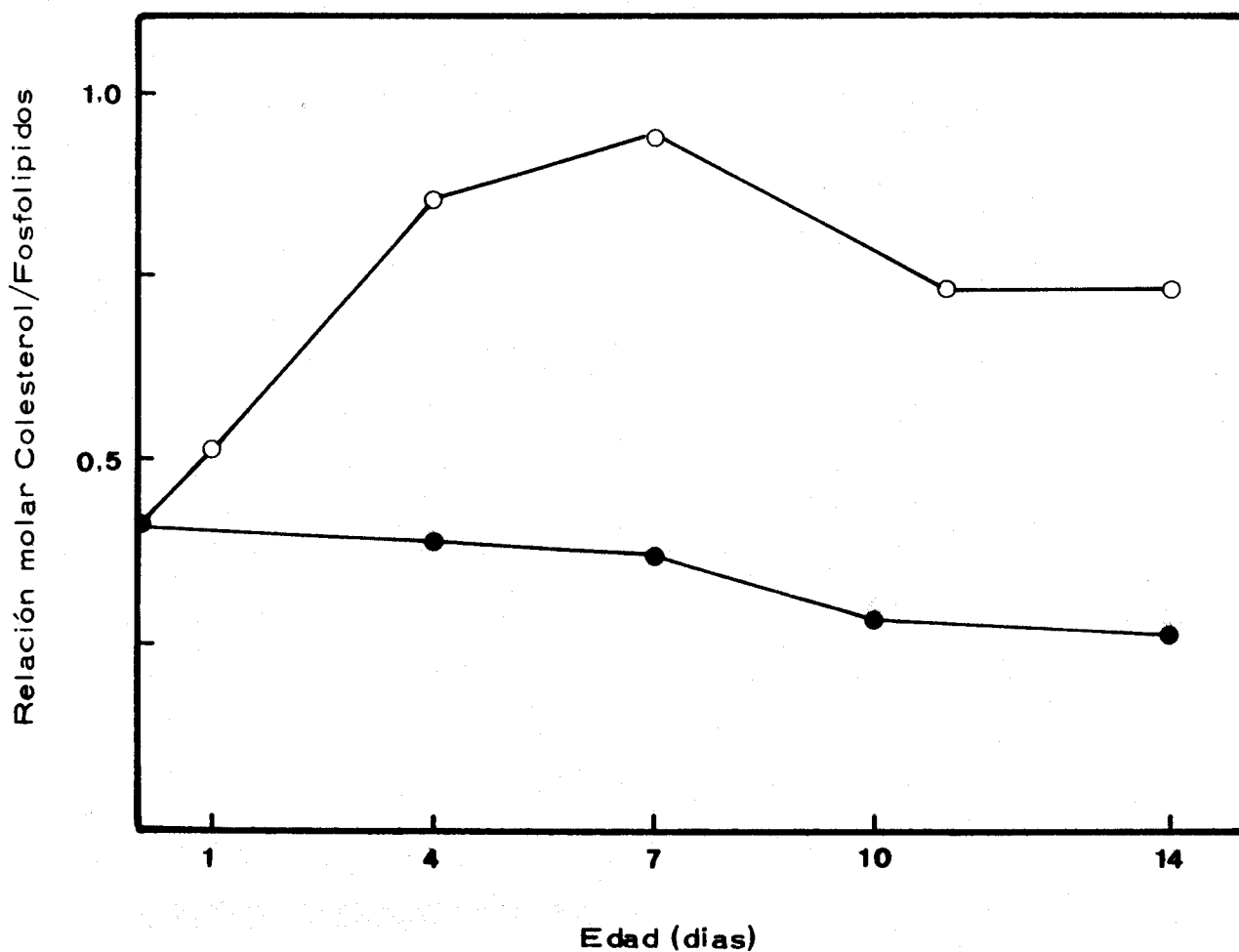
Evolución de los porcentajes de cada fosfolípido en los microsomas de hígado a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estandar; (····) pollos con dieta con colesterol al 2 %.(●) Esfingomielina; (□) fosfatidilcolina; (■) fosfatidilinositol; (○) fosfatidiletanolamina.

TABLA XXX

Influencia de la edad y de una dieta suplementada con colesterol al 2 % sobre la relación molar colesterol / fosforo lipidico en microsomas de hígado de pollo.

Edad (días)	Relación molar C / P	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
0	0.410	-----
1	---	0.514
4	0.390	0.860
7	0.379	0.940
10	0.288	-----
11	-----	0.731
14	0.265	0.730

FIGURA 31



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre las variaciones de la relación molar colesterol / fosforo lipídico de los microsomas de hígado a lo largo de la edad. (●) Pollos con dieta estandar; (○) pollos con dieta rica en colesterol.

Por otra parte, la relación molar C/P, en pollos controles a lo largo de la edad no parece alterarse mucho, si bien, tiende a disminuir a lo largo de los días estudiados, aumentando por tanto su grado de fluidez.

4. D. 2. - Microsomas de cerebro

De la misma manera que en hígado, se han estudiado los componentes lipídicos de la membrana microsomal a lo largo de la edad en pollos con dieta estandar y en pollos con dieta de colesterol al 2 %.

4. D. 2. 1. - Colesterol total, libre y esterificado.

La cantidad de colesterol total presente en la membrana microsomal de cerebro, muestran un incremento continuo en el intervalo (de 0-14 días) en pollos controles.

En el caso de pollos con dieta rica en colesterol, los valores se mantienen ligeramente por encima de los valores control. Los resultados se presentan en la tabla XXXI y fig. 32.

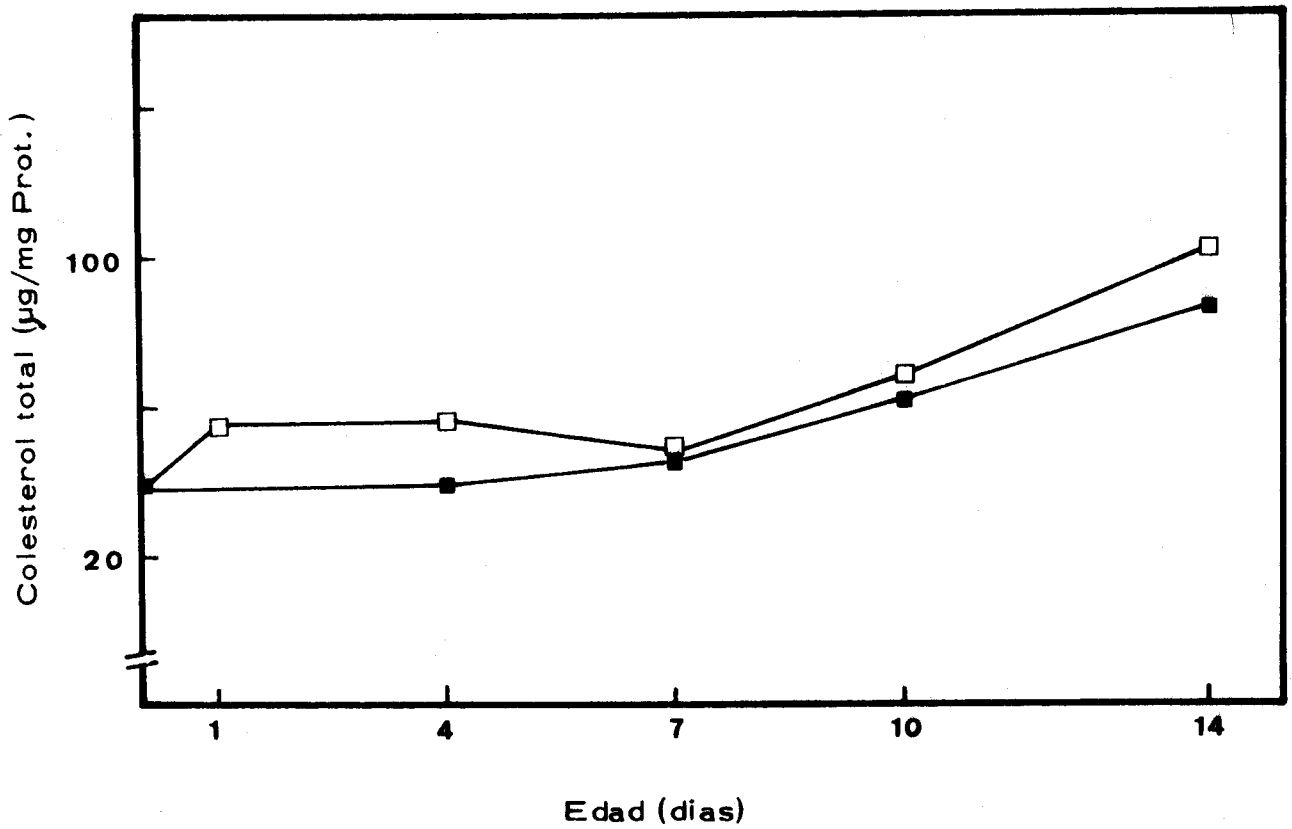
Las determinaciones de colesterol libre y esterificado se muestran en la tabla XXXI (fig. 33), pudiéndose observar que en pollos controles, en todo momento hay un mayor porcentaje de colesterol libre y esterificado a lo largo de la edad, tan solo el día cuatro hay una aproximación de ambos presentándose casi en un porcentaje del 50 % cada uno.

TABLA XXXI

Contenido en colesterol total, libre y esterificado de los microsomas de cerebro durante el periodo postnatal, en pollos con dieta estandar y pollos con dieta con colesterol al 2 ‰.

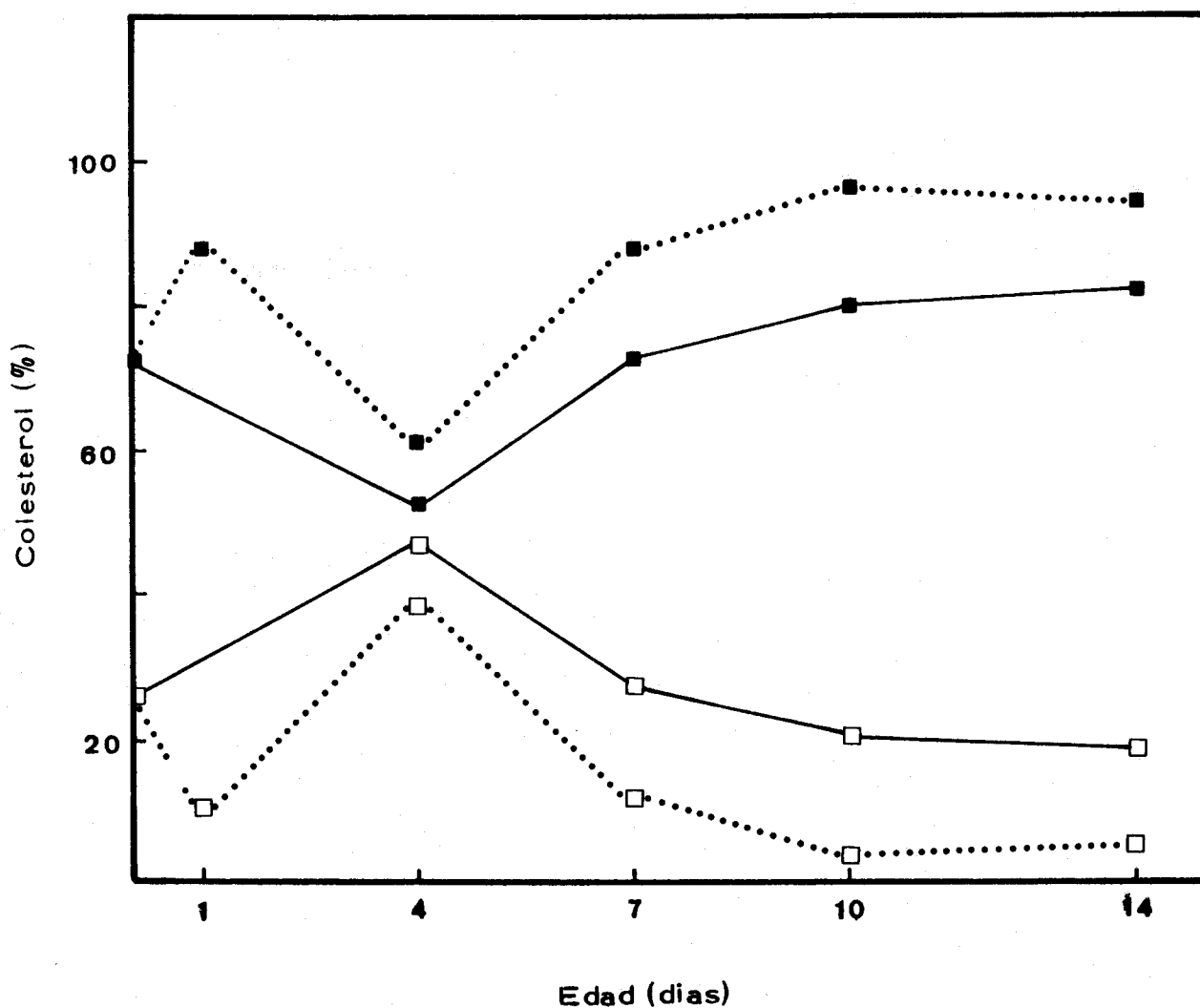
Edad (días)	<u>µg colest/mg. prot.</u>		<u>Dieta estandar</u>				<u>Dieta + colesterol</u>				<u>Col. total</u>	<u>Col. incorporado</u>	
	Dieta	Dieta +	Libre		Esterificado		Libre		Esterificado		Incorporado	Libre	Esterificado
	estandar	colesterol	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	µg/mg	µg/mg
0	38.1	---	27.9	73.2	10.2	26.8	---	---	---	---	---	---	---
1	---	55.1	---	---	---	---	49.3	89.5	5.8	10.5	17	21.4	-4.4
4	39.9	56.6	20.8	52.2	19.1	47.8	34.5	61.0	22.1	39.0	16.7	13.7	3
7	45.1	46.0	32.9	73.0	12.2	27.0	40.5	88.0	5.5	12.0	0.9	7.6	-6.7
10	62.1	68.0	49.7	80.0	12.4	20.0	65.3	96.0	2.7	4.0	5.9	15.6	-9.7
14	87.9	103.0	72.0	81.9	15.9	18.1	96.8	94.0	6.2	6.0	15.1	24.8	-9.7

FIGURA 32



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en colesterol total en los microsomas de cerebro durante las primeras semanas de vida. (■), Pollos con dieta estandar; (□) pollos con dieta de colesterol al 2 %.

FIGURA 33



Cambios en el porcentaje de colesterol libre y esterificado de microsomas de cerebro a lo largo de la edad en pollos alimentados con dieta estandar (—) y pollos alimentados con dieta rica en colesterol (....). (■) Colesterol libre; (□), colesterol esterificado.

En pollos con dieta de colesterol al 2 %, los cambios en los porcentajes de ambas formas a lo largo de la edad son paralelos a los controles. Sin embargo, al contrario que en los microsomas hepáticos, la suplementación de colesterol en la dieta aumenta el porcentaje de colesterol en forma libre y disminuye el esterificado.

4. D. 2. 2.- Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina
esfingomielina y fosfatidilinositol

Al igual que en el caso del hígado, se ha estudiado en microsomas de cerebro, su composición en fosfolípidos y la cantidad total de cada uno de los principales de ellos.

Los resultados que se expresan en la tabla XXXII y fig. 34 muestran las variaciones de fósforo lipídico total a lo largo de la edad, en pollos controles y pollos con dieta rica en colesterol, pudiendo apreciar pequeñas variaciones entre ambos lotes de animales y sucediendo en ambas circunstancias un incremento progresivo de fósforo total durante los días estudiados.

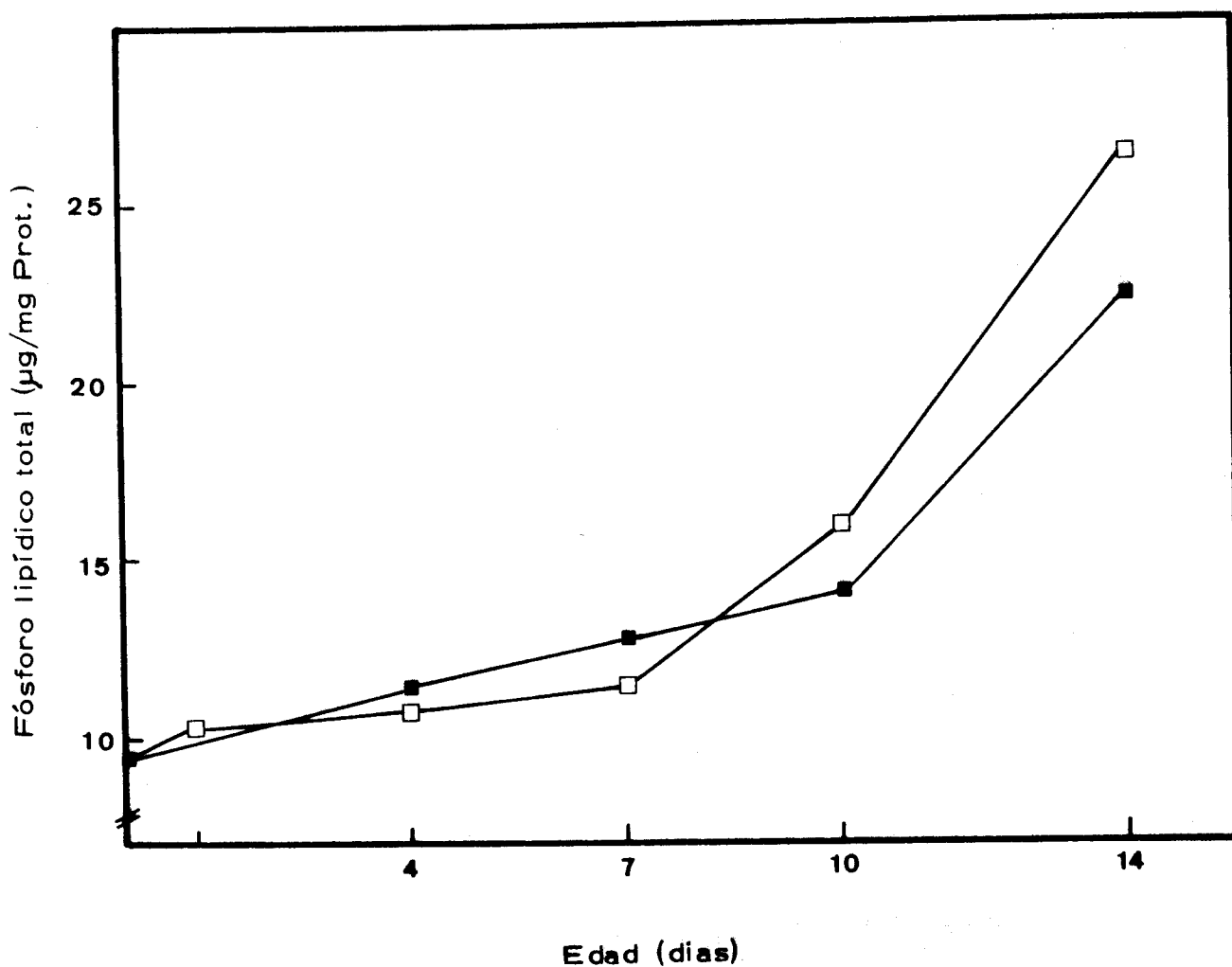
En la tabla XXXIII (fig. 35) se muestran los μg de cada fosfolípido en las condiciones antes señaladas, apreciándose un incremento a lo largo de los días, de los fosfolípidos mayoritarios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol). Las diferencias entre pollos controles y pollos con dieta no son muy grandes, tan solo hay que señalar que la fosfatidilcolina de pollos con dieta rica en colesterol se mantiene siempre con valores superiores a los controles, sobre todo a partir de la primera semana.

TABLA XXXII

Influencia de la edad y de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en fosforo lipidico de los microsomas de cerebro de pollo.

Edad (días)	$\mu\text{g P} / \text{mg prot.}$	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
0	9.4	----
1	---	10.2
4	11.4	10.7
7	12.6	11.3
10	13.9	15.8
14	22.4	26.6

FIGURA 34



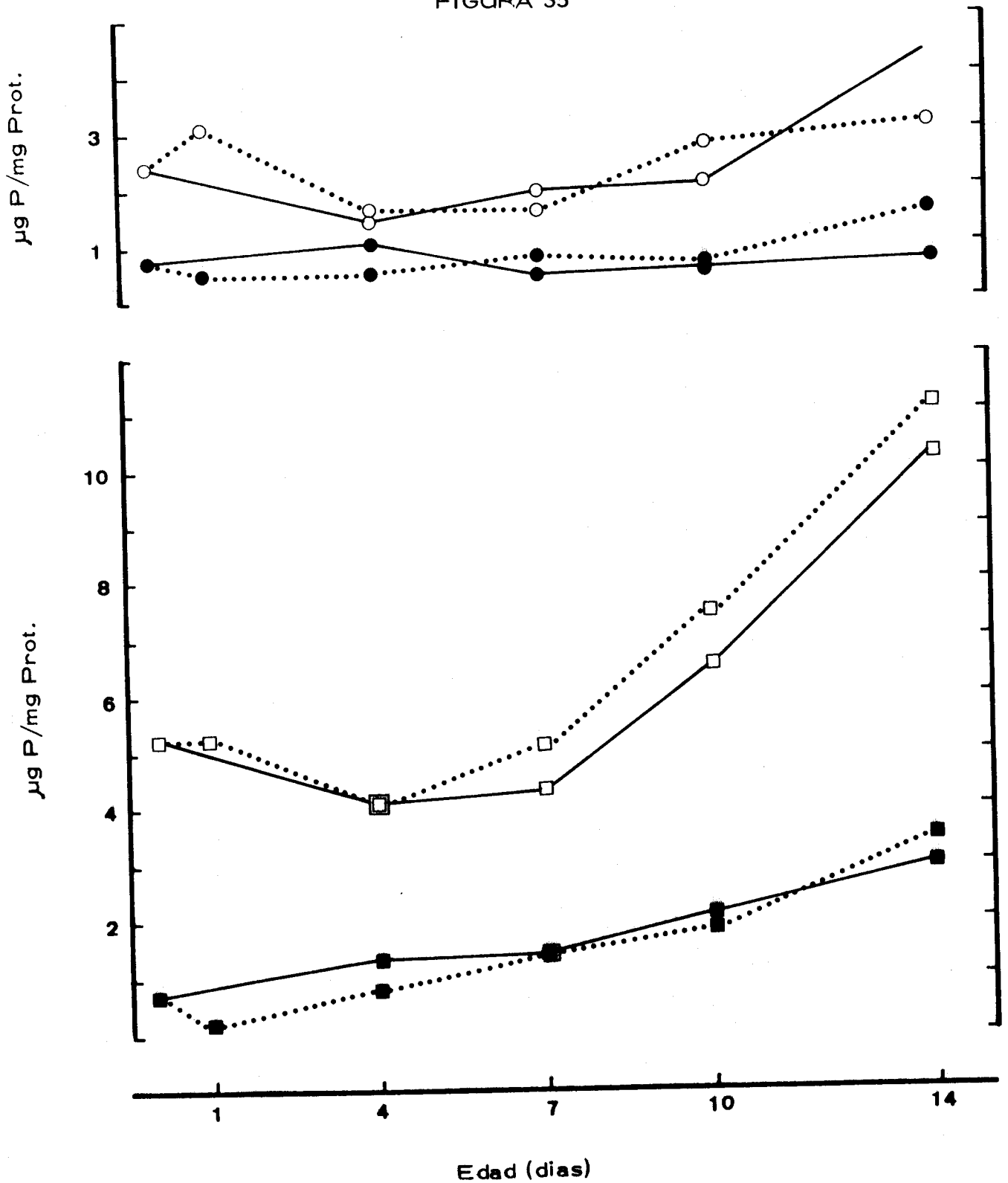
Variaciones en el contenido en fosforo lipídico de los microsomas de cerebro de pollo a lo largo de la edad. (■) Pollos con dieta estandar (□) pollos con dieta rica en colesterol.

TABLA XXXIII

Contenido en esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina de los microsomas de cerebro de pollo a lo largo del desarrollo postnatal en condiciones normales y en condiciones de dieta suplementada con colesterol al 2%.

Edad (días)	Fosforo lipídico ($\mu\text{g P} / \text{mg prot.}$)							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	0.75	5.22	0.70	2.42	---	---	---	---
1	---	---	---	---	0.52	5.22	0.19	3.15
4	1.02	4.08	1.36	1.43	0.50	4.17	0.87	1.53
7	0.43	4.31	1.44	1.95	0.85	5.23	1.42	1.64
10	0.54	6.50	2.11	2.03	0.71	7.58	1.89	2.84
14	0.69	10.31	2.99	4.46	1.65	11.02	3.54	3.15

FIGURA 35



Variaciones de cada fosfolípido en los microsomas de cerebro a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estándar; (....), pollos con dieta con colesterol al 2%. (●), Esfinfomieline; (□), fosfatidilcolina; (■), fosfatilinositol; (○), fosfadiletanolamina.

Por otra parte, los porcentajes relativos de estos fosfolípidos, determinados en microsomas de cerebro en las condiciones repetidamente señaladas, se muestran en la tabla XXXIV y fig. 36, a lo largo de la edad observándose que no hay variaciones apreciables ni en los controles ni en los pollos con dieta de colesterol.

4. D. 2. 3. - Relación molar colesterol / fósforo lipídico

Con la misma intención que en el caso del hígado, se ha determinado la relación molar C/P de las membranas microsomales de cerebro. En pollos normales, los resultados muestran que no hay cambio considerable a lo largo de la edad, mientras que los pollos sometidos a una dieta rica en colesterol presentan un pequeño aumento los cuatro primeros días disminuyendo luego hasta igualarse a los controles.

Los resultados se expresan en la tabla XXXV y fig. 37.

4. D. 3. - Microsomas de asa duodenal

4. D. 3. 1. - Colesterol total, libre y esterificado.

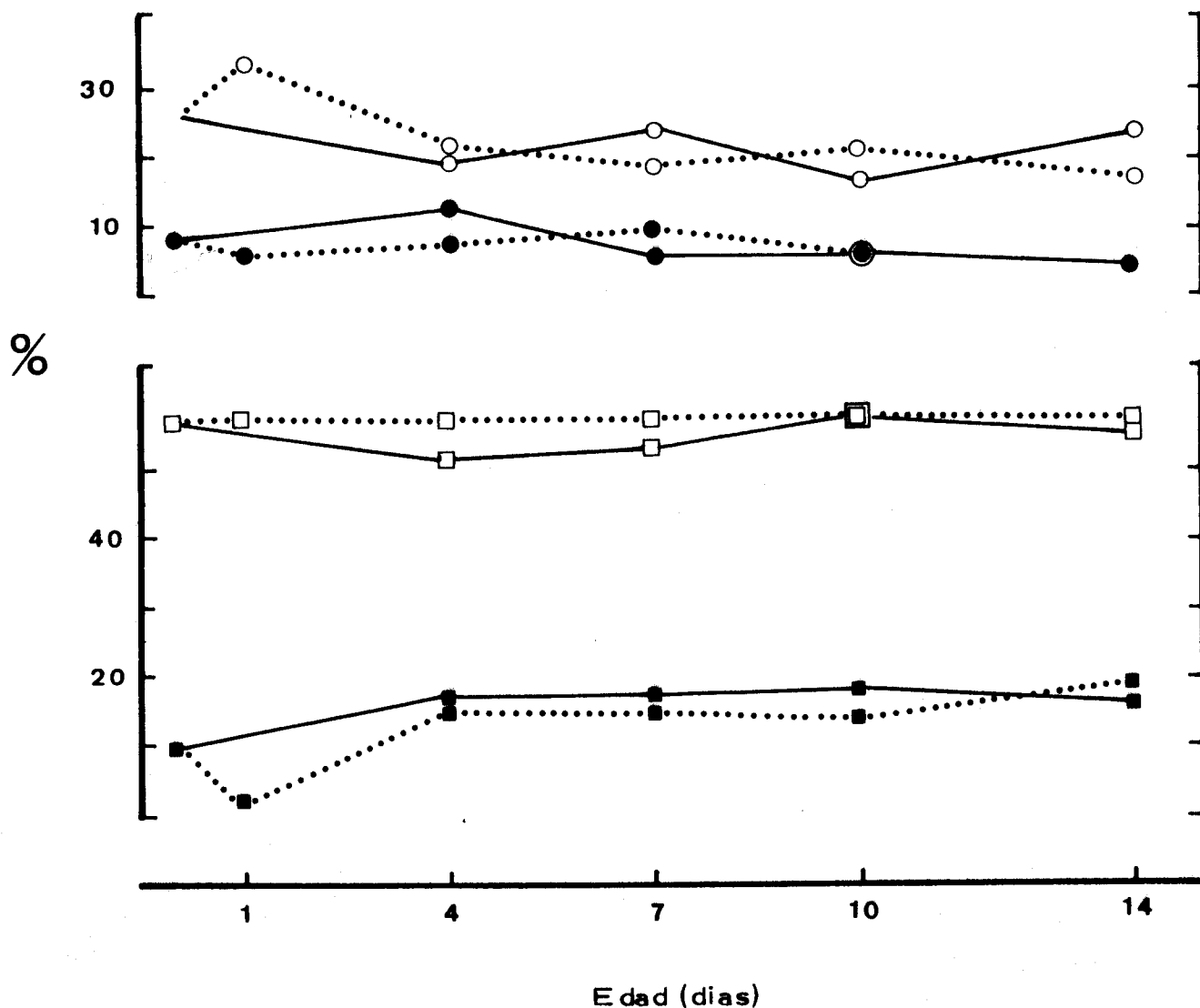
El estudio, en microsomas de intestino, del contenido en colesterol se ha realizado igualmente en lotes de pollos controles alimentados con dieta estandar y pollos sometidos a una dieta rica en colesterol, determinando el colesterol durante un intervalo de 0-14 días del periodo postnatal.

TABLA XXXIV

Influencia de la edad y de una dieta suplementada con colesterol sobre el tanto por ciento de los principales fosfolípidos de los microsomas de cerebro de pollo.

Edad (días)	Fosforo lípidico (%)							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	8.2	57.4	7.7	26.6	---	---	---	---
1	---	---	---	---	5.8	57.3	2.3	34.6
4	12.9	51.7	17.2	18.1	7.1	57.0	14.3	21.6
7	5.2	53.0	17.7	23.9	9.2	57.2	15.5	17.9
10	4.8	58.1	18.7	18.1	5.4	58.3	14.5	21.8
14	3.7	55.8	16.2	24.1	8.5	56.9	18.4	16.2

FIGURA 36



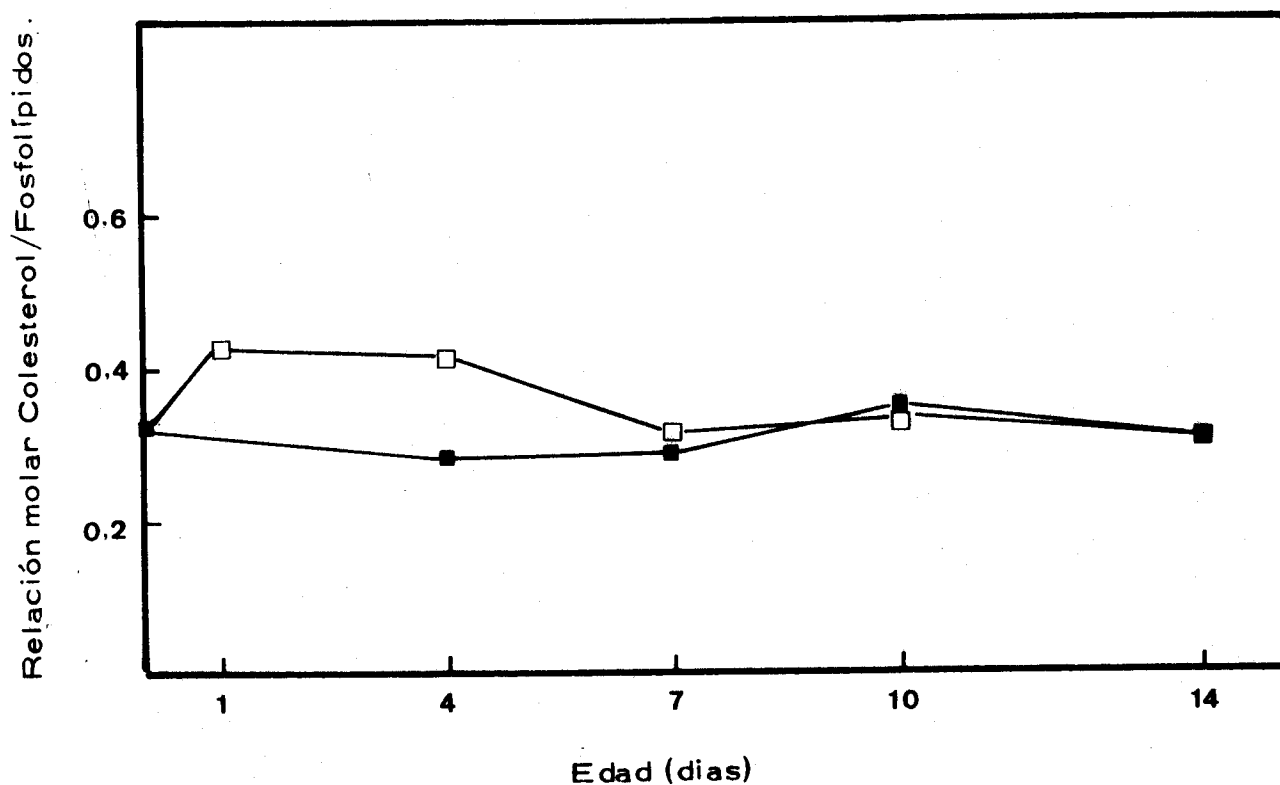
Evolución de los porcentajes de cada fosfolipido en los microsomas de cerebro a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estandar; (····) pollos con dieta con colesterol al 2%. (■) Esfingomieline; (□) fosfatidilcolina; (●) fosfatidilinositol; (○) fosfatidiletanolamina.

TABLA XXXV

Influencia de la edad y una dieta suplementada con colesterol al 2 % sobre la relación molar colesterol / fosfolípido en microsomas de cerebro.

Edad (días)	Relación molar	
	C / P	
	Dieta estandar	Dieta+colesterol
0	0.324	-----
1	-----	0.432
4	0.280	0.423
7	0.286	0.325
10	0.357	0.344
14	0.314	0.310

FIGURA 37



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre las variaciones de relación molar colesterol / fósforo lipídico de microsomas de cerebro a lo largo de la edad, (■) Pollos con dieta estandar; (□) pollos con dieta rica en colesterol.

Los resultados que se muestran en la tabla XXXVI fig. 38 nos indican muy pequeñas variaciones del colesterol total en pollos controles y lo mismo en pollos sometidos a dieta, aunque estos presentan siempre valores superiores a los controles.

En la fig. 39 se muestran los porcentajes de colesterol libre y esterificado en las condiciones señaladas anteriormente pudiéndose apreciar que a partir del cuarto día se incrementa progresivamente el porcentaje de libre a costa de una disminución del esterificado. La suplementación de colesterol en la dieta parece anular las variaciones a lo largo la edad en los porcentajes de cada uno de ellos, existiendo siempre una mayor proporción de forma libre.

4.D.3.2.- Fosfolípidos totales, fosfatidilcolina fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol

En las mismas condiciones del apartado anterior, se han determinado los fosfolípidos totales, mostrándose los resultados en la tabla XXXVII y fig. 40. Podemos apreciar, tanto en controles como en pollos con dieta de colesterol al 2 %, pequeñas variaciones a lo largo de la edad, siendo mayor la cantidad de fósforo lipídico en pollos con dieta de colesterol frente a sus controles, durante la primera semana y menor durante la segunda.

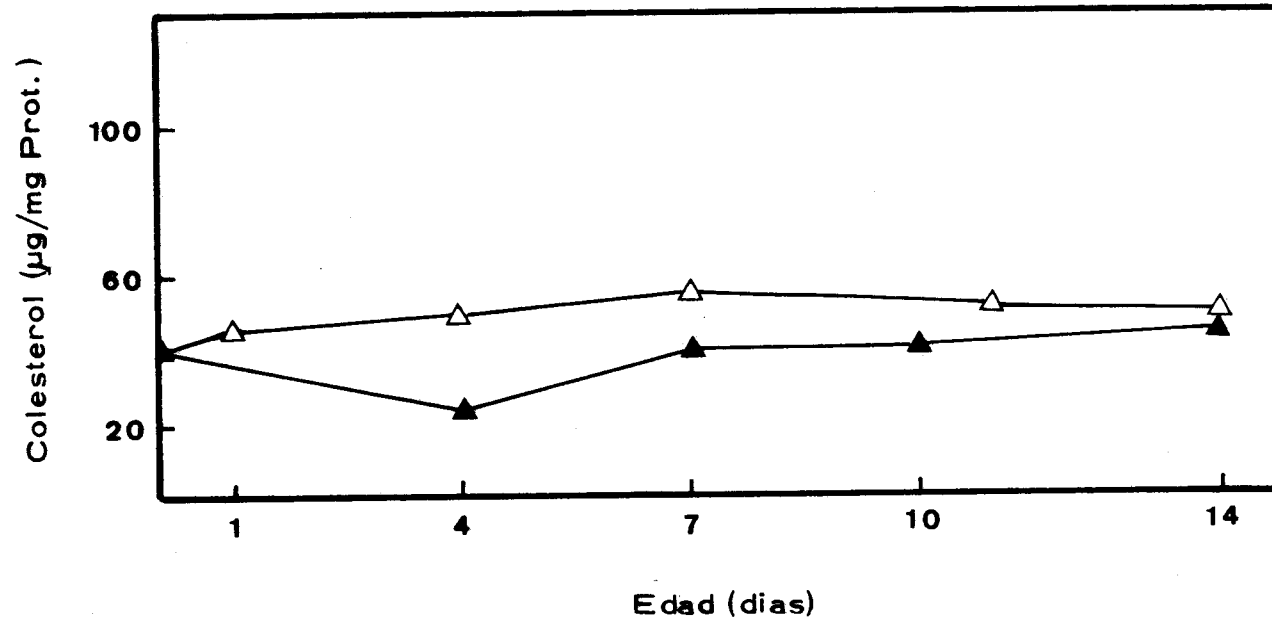
La cantidad de cada fosfolípido presente en pollos controles y pollos con dieta a lo largo de la edad, se muestra en la tabla XXXVIII fig. 41. Se aprecia que, mientras que no aparecen variaciones en los fosfolípidos minoritarios (esfingomielina y fosfatidilinositol), ni con la edad ni con el estímulo del colesterol en la dieta, por el contrario la fosfatidilco-

TABLA XXXVI

Contenido en colesterol total, libre y esterificado de los microsomas de asa duodenal durante el desarrollo postnatal en pollos con dieta estandar y pollos con dieta con colesterol al 2%.

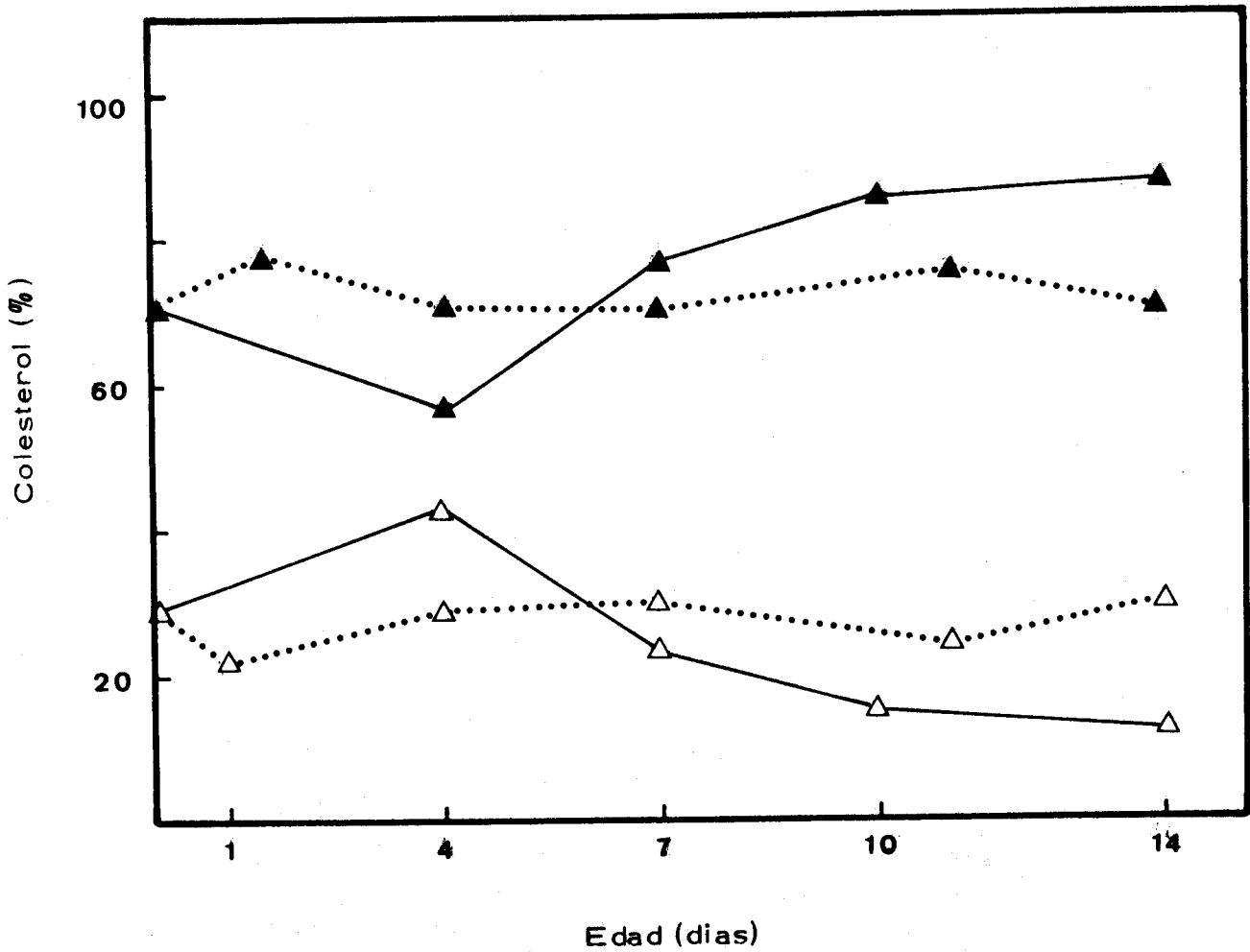
Edad (dias)	<u>µg colest/mg. prot.</u>		<u>Dieta estandar</u>				<u>Dieta+colesterol</u>				<u>col. total</u>	<u>col. incorporado</u>	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol	Libre µg/mg	Esterificado %	Libre µg/mg	Esterificado %	Libre µg/mg	Esterificado %	Libre µg/mg	Esterificado %	Incorporado µg/mg	Libre µg/mg	Esterificado µg/mg
0	39.8	---	28.4	71.4	11.4	28.6	---	---	---	---	---	---	---
1	---	45.9	---	---	---	---	35.6	77.7	10.3	22.3	6.1	7.2	- 1.1
4	23.6	49.4	13.3	56.6	10.2	43.4	35.3	71.4	14.1	18.6	25.8	24.95	3.85
7	39.4	57.7	30.3	76.9	9.1	23.1	40.4	70.0	17.3	30.0	18.3	10.1	8.2
10	41.3	---	35.0	84.7	6.3	15.3	---	---	---	---	---	---	---
11	---	52.6	---	---	---	---	40.0	76.0	12.6	24.0	---	---	---
14	44.9	49.8	39.6	88.3	5.3	11.7	34.9	70.0	14.9	30.0	4.9	-4.7	9.6

FIGURA 38



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en colesterol total de los microsomas de asa duodenal durante las primeras semanas de vida. (▲). Pollos con dieta estandar; (△) pollos con dieta de colesterol al 2%.

FIGURA 39



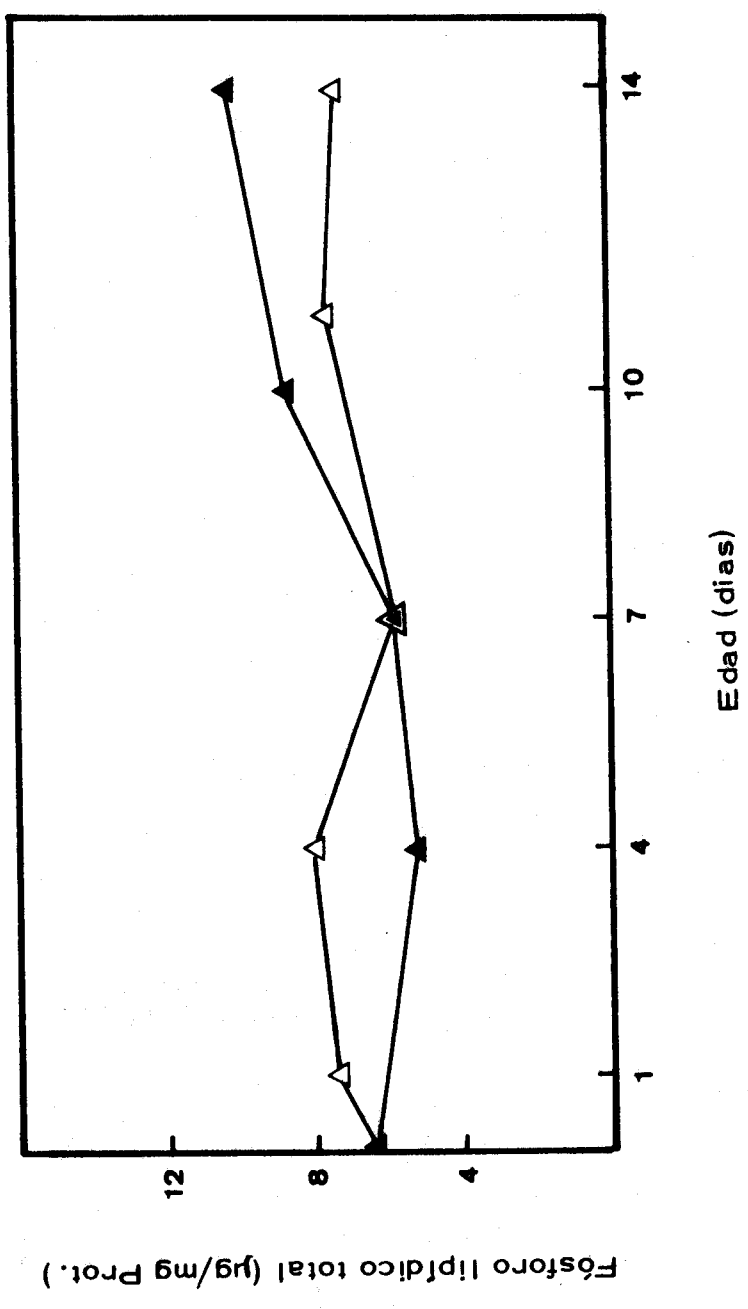
Cambios en el porcentaje de colesterol libre y esterificado de microsomas de asa duodenal a lo largo de la edad en pollos alimentados con dieta estandar (—) y pollos alimentados con dieta rica en colesterol (···). (▲) Colesterol libre; (△), colesterol esterificado.

TABLA XXXVII

Influencia de la edad y de la suplementación de colesterol a la dieta sobre el contenido en fosforo lipídico de los microsomas de asa duodenal de pollo.

Edad (días)	Fosforo total	
	$\mu\text{g} / \text{mg prot.}$	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
0	6.4	---
1	---	7.4
4	5.2	8.0
7	5.8	5.8
10	8.7	---
11	---	7.7
14	10.2	7.2

FIGURA 40



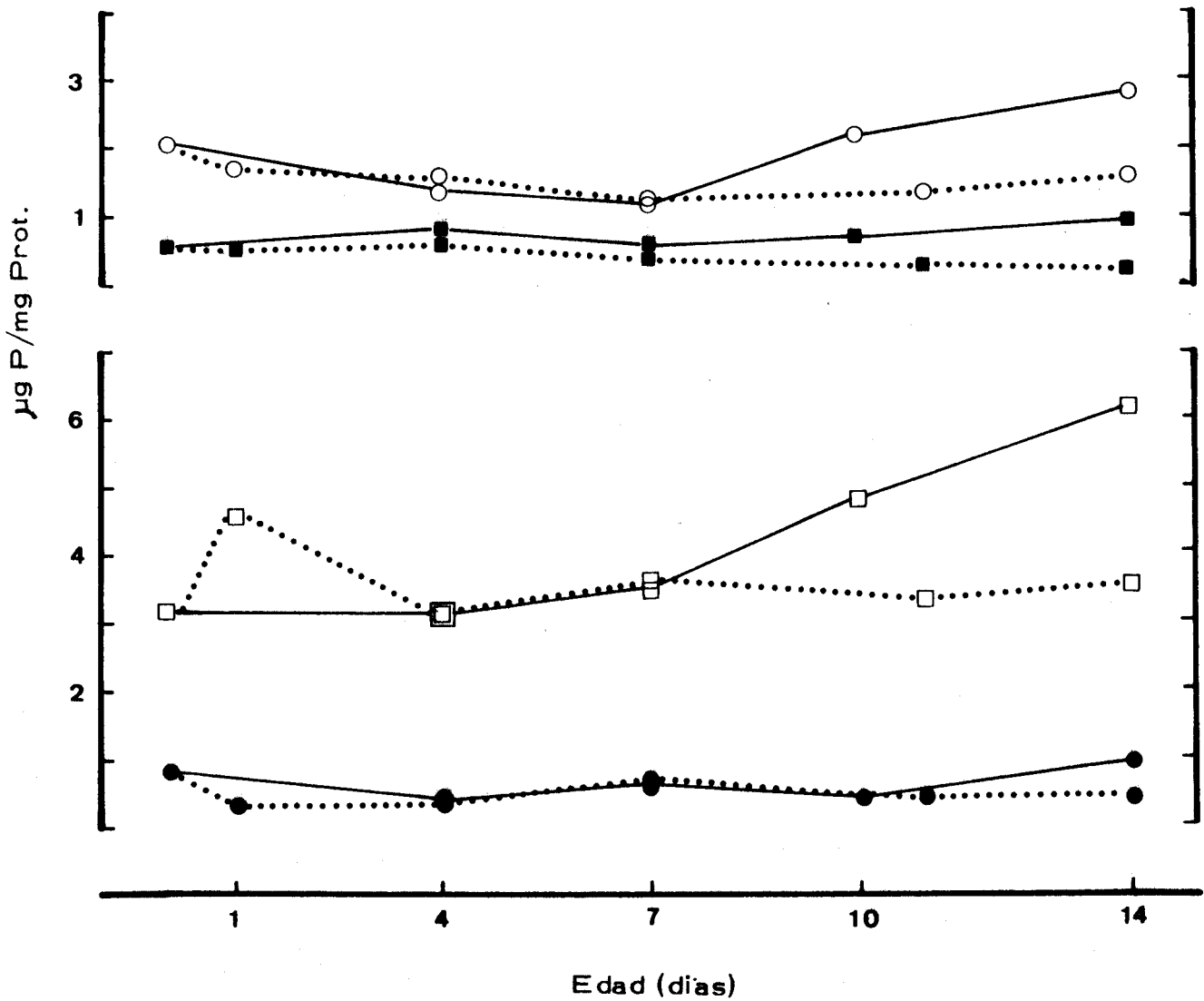
Variaciones en el contenido en fosforo lipidico de los microsomas de asa duodenal de pollo a lo largo de la edad. (▲). Pollos con dieta estandar. (△) Pollos con dieta rica en colesterol.

TABLA XXXVIII

Contenido en esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina de los microsomas de asa duodenal de pollo a lo largo del desarrollo postnatal en condiciones normales y en condiciones de dieta suplementada con colesterol al 2 %.

Edad (días)	$\mu\text{g}^{\text{P}} / \text{mg Prot.}$							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	0.78	3.13	0.49	2.01	---	---	---	---
1	---	---	---	---	0.32	4.57	0.48	1.68
4	0.34	3.10	0.82	1.38	0.32	3.16	0.59	1.57
7	0.58	3.49	0.58	1.16	0.62	3.60	0.38	1.20
10	0.41	4.80	0.71	2.19	---	---	---	---
11	---	---	---	---	0.44	3.30	0.27	1.33
14	0.91	6.16	0.96	2.84	0.39	3.51	0.21	1.58

FIGURA 41



Variaciones de cada fosfolípido en los microsomas de asa duodenal a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estandar; (···) pollos con dieta con colesterol al 2 %. (●) Esfingomielina; (□) fosfatidilcolina; (■) fosfatidilinositol; (○) fosfatidiletanolamina.

lina en controles, aumenta con la edad mientras que la fosfatidiletanolamina tiende a aumentar durante la segunda.

En pollos con dieta suplementada con colesterol la cantidad de fosfatidilcolina casi se mantiene durante los días ensayados, presentándose en niveles por debajo de sus controles durante la segunda semana. La fosfatidiletanolamina tampoco varía con la edad en condiciones de dieta quedando también por debajo de sus controles en la segunda semana.

En lo referente a los porcentajes de cada fosfolípido en las condiciones antes citadas, podemos apreciar por la tabla XXXIX y fig. 42 que estos no varían apenas con la edad ni con una dieta rica en colesterol, siendo siempre la fosfatidilcolina el fosfolípido que presenta mayor porcentaje seguido de la fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol.

4. D. 3. 3. - Relación molar colesterol / fósforo lípido.

Al igual que en los tejidos anteriores, se estudiaron los cambios en el grado de fluidez de las membranas microsomales de asa duodenal en pollos con dieta estandar durante el periodo postnatal, y en pollos con dieta rica en colesterol, tratando de ver su relación con los cambios apreciados en la actividad HMG-CoA reductasa microsomal.

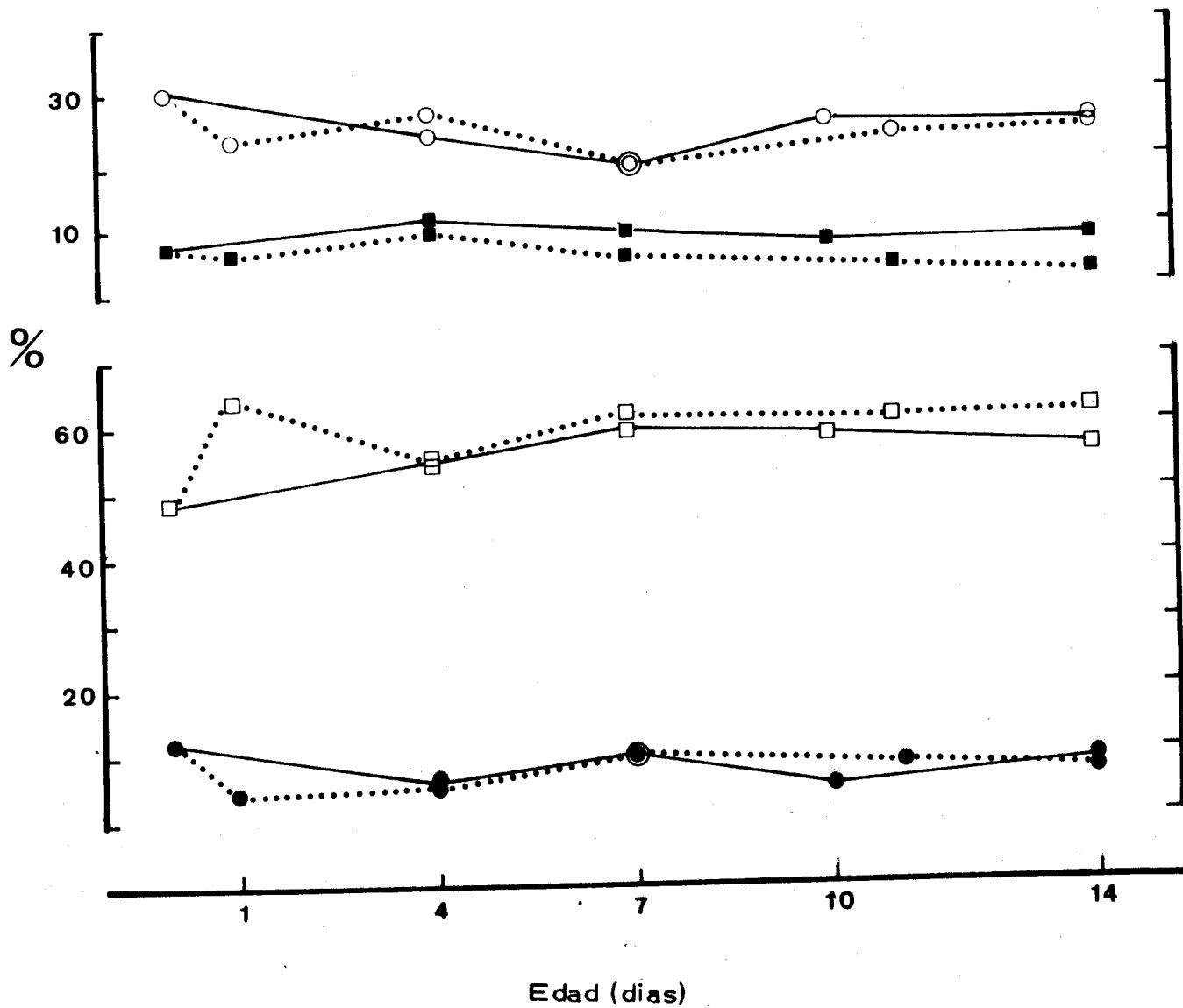
En la tabla XL y fig. 43 se indican los resultados. Se observan variaciones de la relación molar a lo largo de la edad en pollos controles. Estas mismas variaciones se producen de forma paralela en pollos con dieta de colesterol pero con una relación molar superior, lo que indica un grado de fluidez menor en pollos tratados con colesterol en la dieta.

TABLA XXXIX

Influencia de la edad y de una dieta suplementada con colesterol sobre el tanto por ciento de los principales fosfolipidos de los microsomas de asa duodenal de pollos.

Edad (dias)	%							
	Dieta estandar				Dieta + colesterol			
	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE
0	12.2	48.8	7.7	31.3	---	---	---	---
1	---	---	---	---	4.5	64.7	6.8	23.8
4	6.0	55.0	11.5	24.5	5.7	56.0	10.5	27.8
7	10.0	60.0	10.0	20.0	10.7	62.0	6.5	20.7
10	5.1	59.1	8.7	27.0	---	---	---	---
11	---	---	---	---	8.2	61.8	5.1	24.9
14	8.4	56.5	8.9	26.2	6.8	61.7	3.7	27.8

FIGURA 42



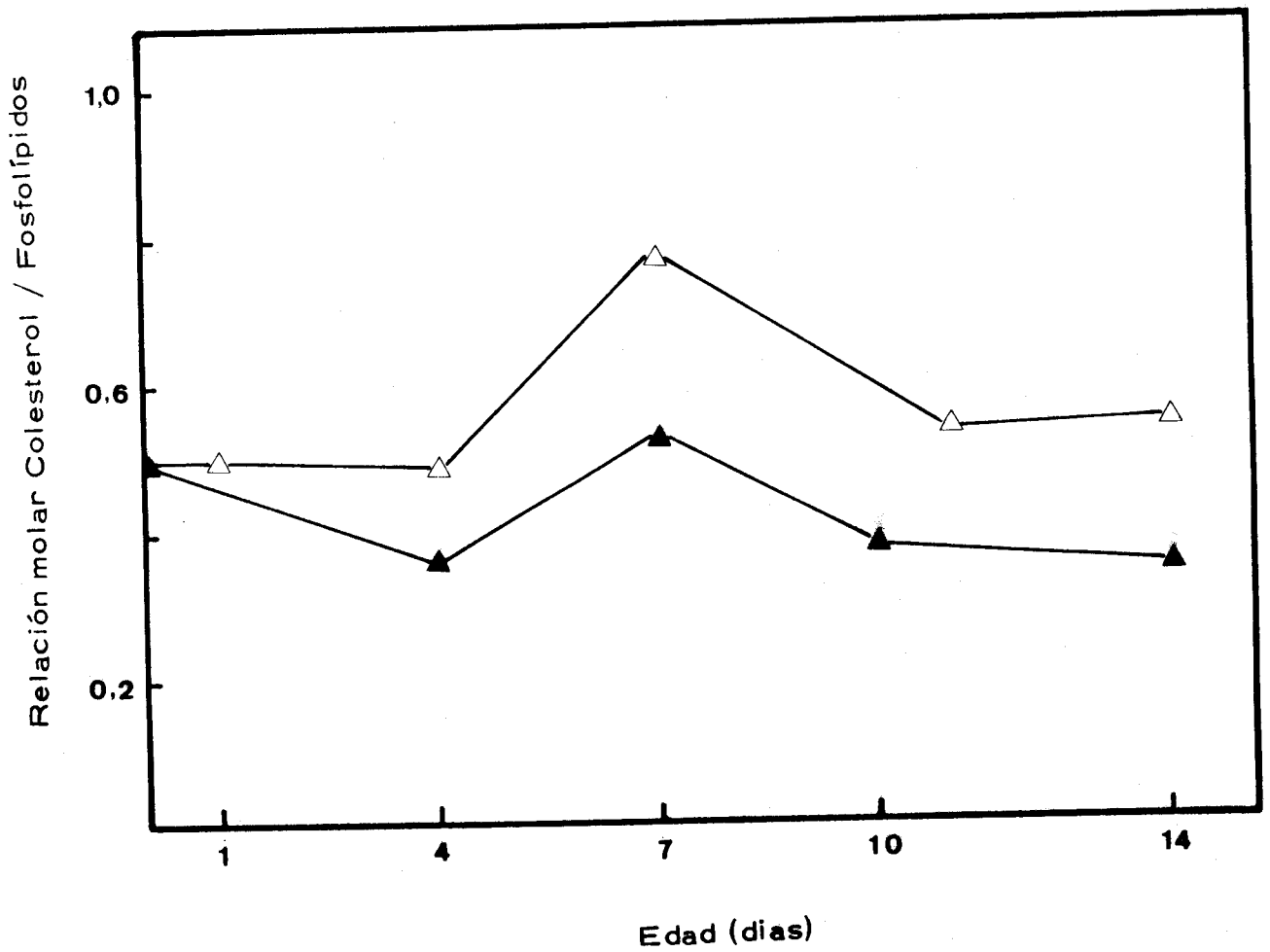
Evolución de los porcentajes de cada fosfolípido en los microsomas de asa duodenal a lo largo de la edad. (—) Pollos con dieta estándar; (···) pollos con dieta con colesterol al 2%. (●) Esfingomielina; (□) fosfatidilcolina; (■) fosfatidilinositol; (○) fosfatidiletanolamina.

TABLA XL

Influencia de la edad y de una dieta suplementada con colesterol al 2 % sobre la relación molar colesterol / fosforo lipidico en microsomas de asa duodenal de pollo.

Edad (dias)	Relación molar	
	C / P	
	Dieta estandar	Dieta + colesterol
0	0.499	-----
1	-----	0.496
4	0.363	0.494
7	0.544	0.795
10	0.379	-----
11	-----	0.545
14	0.353	0.553

FIGURA 43



Influencia de la suplementación de colesterol a la dieta sobre las variaciones de la relación molar colesterol / fosforo lipidico de los microsomas de asa duodenal a lo largo de la edad. (▲) Pollos con dieta estandar; (△) pollos con dieta rica en colesterol.

V DISCUSION

Consideraciones generales.

La importancia de la HMG-CoA reductasa como enzima clave en la biosíntesis del colesterol explica el elevado número de grupos de trabajos que en la actualidad se dedican a su estudio desde diversos puntos de vista. Por una parte, hemos de destacar los estudios encaminados a relacionar la actividad reductasa con la mayor o menor intensidad de la biosíntesis del colesterol, principalmente con objeto de contribuir a la prevención y / o mejora de aquellos estados patológicos derivados de un desequilibrio en el contenido de colesterol. En este sentido podemos mencionar todos aquellos trabajos que tratan de explicar la acción hipocolesterolémica de numerosos productos, naturales o sintéticos, mediante su actuación a nivel de la reductasa. Por otra parte, existe otra línea de trabajo relacionada fundamentalmente con la regulación de la enzima por factores fisiológicos que de alguna manera afectan a la biosíntesis de colesterol. Entre estos factores hay que mencionar a los distintos tipos de dieta, a las hormonas y, fundamentalmente, aquellos relacionados con los cambios ritmicos exhibidos por un proceso o una enzima a lo largo del día, conocidos bajo el nombre de ritmo diurno.

Todos estos estudios se han realizado sobre animales adultos, generalmente rata y raton, siendo muy escasos los conocimientos que actualmente se poseen sobre la regulación del proceso biosintético mencionado en animales no mamíferos y, mas concretamente, en aves. Asimismo, a pesar de la importancia del colesterol como constituyente lípidico mayoritario de la mielina, es muy poco lo que se conoce hasta el momento sobre la regulación de su síntesis durante aquellas etapas del desarrollo caracterizadas por un elevado grado de formación de mielina.

Los resultados presentados en esta Memoria Doctoral forman parte de una línea de trabajo orientada al estudio de la regulación de la biosíntesis del colesterol durante la mielinización del pollo. Resultados anteriores obtenidos respecto a las variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado, de distintos órganos de este animal durante el desarrollo postnatal, así como sobre algunas de las enzimas del metabolismo del ácido mevalónico, (214, 215) ponían de manifiesto la necesidad de estudiar los posibles cambios en la actividad HMG-CoA reductasa, así como alguno de los mecanismos de regulación a los que podía verse sometida la enzima durante esta etapa del desarrollo.

Como fase preliminar del estudio, se hizo necesario disponer de un sistema exacto y altamente repetitivo para la determinación de los pequeños niveles de la actividad reductasa, que permitiera a la vez la demostración inequívoca de que las posibles variaciones observadas fuesen reales y no derivadas de artefactos en la determinación. La actividad reductasa es, en efecto, la más baja entre las exhibidas por las enzimas que intervienen en esta etapa biosintética, actuando como factor limitante de la velocidad de síntesis del colesterol (216). Los métodos colorimétricos descritos para su determinación presentan el gran inconveniente de su falta de especificidad cuando se manejan, como en este caso, preparaciones enzimáticas no purificadas. Mucho más específicos son los sistemas que se basan en la cuantificación del producto de la reacción, y entre ellos, los métodos radioisotópicos.

En el presente trabajo se ha utilizado en esencia el sistema descrito por Shapiro y col. (135) en 1974. basado en la cuantificación al estado de lactona de todo el ácido mevalónico originado en la reacción, a partir de ^{14}C -HMG-CoA, sin necesidad de su extracción con éter. Como

patrón interno se ha utilizado ^3H -MVA, lo cual permite un mejor aislamiento por cromatografía en capa fina. Sin embargo, a pesar de utilizar el mismo líquido de desarrollo y las mismas condiciones que las descritas por Shapiro (135) para la cromatografía en capa fina, el valor R_f observado para la mevalonolactona fué diferente del esperado; 0.3-0.5 frente al 0.6-0.9 descrito. Este resultado ha sido constatado repetidamente, tanto en el caso de utilizar producto marcado con ^{14}C como con ^3H . Asimismo, en experiencias llevadas a cabo con objeto de simular la reacción enzimática, la mevalonolactona queda separada del sustrato de la reacción apareciendo con un R_f 0.3-0.5. La recuperación del producto de la reacción fué más o menos semejante en ambos tipos de experiencias, de donde se deduce la no interferencia del HMG-CoA en la determinación del MVA, incluso cuando la relación sustrato/producto es del orden 10/1.

Por otra parte, los resultados obtenidos en experiencias simuladas realizadas en ausencia del sistema regenerante de NADPH necesario para la actividad enzimática, han permitido poner de manifiesto que la posible interferencia debida a la producción inespecífica de HMG-libre por hidrólisis del HMG-CoA no es de tener cuenta en nuestro caso, ya que la radiactividad recuperada en la zona correspondiente al HMG - que coincide con la de la mevalonolactona- es independiente de la cantidad de preparación enzimática utilizada y, en todo caso, despreciable frente a la cantidad de MVA originado.

Las variaciones descritas en la bibliografía para la actividad HMG-CoA reductasa no solamente resultan imputables a las distintas condiciones fisiológicas sino que parece haberse demostrado una notable influencia del sistema de preparación enzimática, especialmente, respecto

al tampon utilizado para el aislamiento de los microsomas. En este sentido, hemos procedido al estudio de la posible influencia de cada uno de los factores usados como "protectores" en dicho aislamiento : DTT, CINA y EDTA. Se han probado diferentes concentraciones de cada "protector", observando se que las concentraciones descritas por Shapiro (135) y utilizadas por nosotros corresponden bien al máximo de actividad o a zonas muy próximas, no existiendo además los inconvenientes que una concentración mas elevada podría originar (ver caso del EDTA). De la misma manera se ha demostrado en otra serie de experiencias que la concentración usada de cada "protector" no interfiere en la determinación de proteínas, según el método de Lowry, obviando así el posible inconveniente mencionado por algunos autores, especialmente cuando se trabaja con concentraciones elevadas de DTT. En cualquier caso, las concentraciones utilizadas por nosotros no influyen de ninguna manera sobre los valores de proteínas observadas, conclusión a la que se ha llegado determinando las proteínas de una misma suspensión microsomal en presencia de cantidades crecientes de los distintos "protectores" ensayados.

Todas las experiencias anteriormente expuestas nos han permitido disponer de un sistema altamente reproducible para la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa de diferentes órganos de pollo. Ello ha constituido la primera parte de los resultados agrupados como puesta a punto de la determinación de la actividad enzimática. Sin embargo, también consideramos necesario establecer la proporcionalidad entre la actividad enzimática observada y el tiempo de incubación de la reacción, por una parte, y la cantidad de proteína microsomal usada, por otra parte. Ambas particularidades han sido establecidas, lo cual nos ha permitido manejar preparaciones microsomales de los distintos órganos de pollo de diferente

concentración protéica, dentro de los márgenes previamente encontrados, así como poder expresar en cada caso la actividad HMG-CoA reductasa como actividad específica en pmoles/min/mg proteína.

Un último aspecto sobre el que deberíamos tener plena seguridad en nuestros resultados, antes de estudiar las posibles variaciones debidas a los cambios de edad, se refería a las condiciones de mantenimiento de la enzima. Por una parte, se ha estudiado la estabilidad de la enzima a 4°C durante un periodo de 48 h al estado de suspensión microsomal. Al cabo de este tiempo la enzima perdía alrededor de un 50 % de su actividad, pérdida que era prácticamente despreciable durante las primeras 7 h. de conservación, por lo que se estableció este límite para todas las determinaciones. Por otra parte y en una serie paralela de experiencias, se estudió la posible influencia del ion F^- sobre la estabilidad de la enzima en las mismas condiciones anteriores. En efecto, se ha descrito recientemente y por varios autores (148, 157) la existencia de dos formas de la enzima, una fosforilada (inactiva) y otra defosforilada (activa) interconvertibles a través de sendas reacciones catalizadas enzimáticamente. La activación por una fosfatasa puede ocurrir durante el aislamiento de los microsomas (150). En nuestro caso, la pérdida de actividad observada durante el mantenimiento a 4°C no es compatible con la activación que podría esperarse en tales condiciones. Podría objetarse, que esta inactivación fuese mayor en presencia de ion F^- , conocido inhibidor de las fosfatasas, ya que actuaría impidiendo la activación enzimática de la reductasa y, por tanto, disminuyendo su actividad neta. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro caso son semejantes tanto en presencia como en ausencia de ion F^- , lo cual parece indicar la independencia de la inactivación a 4°C respecto al proceso enzimático de interconversión, y lo que es más importante, confirma que no existe

activación de la reductasa durante la manipulación de las suspensiones microsomales. Estos resultados no concuerdan con la activación de 5-7 veces observada por Nordstrom y col, (150) durante el aislamiento de los microsomas de hígado de rata, incremento que era bloqueado por la utilización de FNa 50 mM. Sin embargo hay que mencionar que esta activación suele ser dependiente de la temperatura. En efecto, ya en los primeros trabajos sobre este tema, Berndt y Gaumert (217) demostraron que la activación era muy rápida a 37°C pero prácticamente nula a 0°C. Asimismo, hay que resaltar que en los únicos trabajos existentes sobre la HMG-CoA reductasa de aves debidos al grupo de Beg (218-220) no se menciona la activación por defosforilación descrita en hígado de rata e incluso, en el último de estos trabajos (220) parece haberse demostrado que la actividad enzimática no se incrementa por preincubación a 37°C durante 20 min. de cualquiera de las formas; microsomal, solubilizada o altamente purificada de la enzima. Los resultados de Beg en hígado de gallinas ponedoras coinciden con los nuestros obtenidos en hígado de pollo recién nacido y aunque en ningún caso pueden considerarse como expresión de la imposibilidad de existencia de formas interconvertibles de la enzima, sí, en cambio, demuestran que no ha habido activación durante la manipulación previa a las determinaciones. Queda, por último, abierta la posibilidad de que el mecanismo de modulación covalente de la reductasa sea dependiente de la edad, de la misma manera que el conocido ritmo diurno de la enzima de hígado parece presentarse en el pollo a partir de un cierto día, incrementándose su amplitud a lo largo del desarrollo postnatal. (221).

En cualquier caso, la significación fisiológica de la fosforilación -defosforilación de la reductasa no ha sido aun establecida puesto que la mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo "in vitro".

Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa a lo largo de la edad

La segunda parte de esta Memoria Doctoral comprende las variaciones exhibidas por la HMG-CoA reductasa en diferentes órganos de pollo durante los primeros días después de la eclosión. Como decíamos en la introducción, esta etapa de la vida del pollo corresponde a aquellos días en que está finalizando la mielinización, a la vez que involucre rápidamente el saco vitelino (hasta 5-6 días aproximadamente) y a los días, en los que el animal desarrolla sus propios mecanismos biosintéticos (6-15 días aproximadamente).

El conocimiento de los cambios que una enzima puede sufrir en relación con la edad, forma parte de lo que actualmente se conoce con el nombre de "historia del desarrollo" de las enzimas y que tanta importancia está adquiriendo con vistas a la diferenciación enzimática. De acuerdo con ella, las enzimas pueden clasificarse en varias categorías, atendiendo fundamentalmente al tiempo en que emergen o bien al tiempo en que sufren un cambio brusco en su "cantidad". Así, la emergencia de las enzimas en determinadas etapas del desarrollo, así como su teleonomía y las peculiaridades de estos fenómenos en rata, fué estudiado con un cierto detalle por Geengard en 1971 (222). Posteriormente la misma autora publicó otra revisión sobre los cambios de varias enzimas durante el desarrollo del pollo (84), estableciendo algunas particularidades y corolarios fisiológicos de la diferenciación enzimática. En este sentido, puesto que las enzimas al ser sintetizadas por primera vez originan nuevas potencialidades metabólicas, la fecha de tales apariciones pueden marcar un hito en las necesidades fisiológicas relacionadas con los cambios en el ambiente interno o externo de un determinado ser vivo. Aunque los cambios cuantitativos de ciertas funciones son difíciles de medir

no hay duda de que las variaciones en las "cantidades" enzimáticas pueden ser buenos indicadores de los cambios de capacidad catalítica "in vivo".

Por otra parte, principalmente por razones históricas, la naturaleza y la cantidad de información sobre la diferenciación enzimática en mamíferos es muy distinta a la existente en aves. En efecto mientras que el número de enzimas estudiadas en órganos de mamíferos adultos es mayor que el descrito en aves, la Bioquímica del embrión de pollo está mejor conocida en términos enzimáticos que la del feto de rata. Asimismo, en los trabajos sobre pollo es muy frecuente la comparación entre el comportamiento de varios órganos mientras que el 90 % de los estudios en mamíferos han sido realizados en el hígado.

Concretándonos a la biosíntesis del colesterol, solo existen pocos datos y muy fragmentarios sobre su evolución en aves (75, 82, 86, 87). Ello nos llevó a estudiar, en anteriores trabajos, la evolución del contenido en colesterol total, libre y esterificado, en distintos órganos del pollo durante la etapa postnatal, para ampliarlos posteriormente sobre la evolución de algunas de las actividades enzimáticas implicadas en su biosíntesis. Con este objeto se han obtenido los resultados de la presente memoria Doctoral que se discuten a continuación.

En primer lugar, las variaciones exhibidas por la reductasa hepática muestran que no existe prácticamente actividad durante los 5 primeros días de vida, incrementándose de una manera brusca hasta los días 9-10 aproximadamente, a partir de los cuales tiende a estabilizarse. Los resultados obtenidos previamente sobre el colesterol hepático durante los mismos días ponían de manifiesto una disminución muy acusada del total durante los 4-5 primeros días disminuyendo más lentamente después

hasta llegar a estabilizarse (213). Sin embargo, cuando se examinaron los cambios en los porcentajes de colesterol libre y esterificado, se observó un claro aumento de la forma libre hacia los días 4-5, llegando a una clara inversión de los porcentajes hacia los días 7-8, a partir de los cuales predominaba marcadamente el colesterol libre. Esto parecía indicar que la mayor parte del colesterol existente en el hígado durante los primeros días procede de la yema (forma esterificada), no siendo necesario el funcionamiento de los propios mecanismos biosintéticos. Sin embargo, cuando este colesterol disminuye, el animal tiene que afrontar sus propios requerimientos, comenzando entonces a sintetizarse "de novo" las cantidades necesarias de colesterol. En este sentido, la aparición y fuerte incremento observado en la actividad reductasa en estos días, coincidentes como hemos dicho con la involución del saco vitelino, está completamente de acuerdo con los requerimientos biosintéticos en colesterol. No podía ser de otra forma, habida cuenta de la importancia de esta enzima en el proceso metabólico en estudio. Un incremento del mismo tipo, aunque menos acusado, se ha observado también en la actividad mevalonato cinasa de hígado de pollo, mientras que los niveles de fosfomevalonato cinasa no parecen verse afectados sensiblemente con la edad (223).

Al intentar comparar nuestros resultados con los reseñados en mamíferos hay que indicar que la eclosión en pollo y el destete en rata pueden ser considerados como puntos análogos, por cuanto que son ambos los que representan el paso final hacia la independencia. Los trabajos de McNamara y col. por una parte (142) y los de Ness y col. por otra (146), muestran un fuerte incremento de la actividad reductasa de hígado de rata a partir del momento del destete, lo cual vendría a corroborar lo afirmado anteriormente. Asimismo, la prácticamente nula actividad observada duran

te la última etapa de la lactacia vendria a coincidir con los resultados puestos de manifiesto en hígado de pollo durante los 5 primeros dias de vida.

La principal explicación dada generalmente a los cambios de la actividad reductasa hepática suele basarse en considerarlos como respuesta a la ingestión de colesterol con la dieta. En efecto, es conocido que el colesterol, especialmente en forma esterificada disminuye fuertemente la actividad en hígado de rata adulta y que existe una relación inversa entre la concentración hepática de colesterol y la actividad reductasa (119). Por tanto, dado que la leche de rata contiene colesterol, los cambios en la actividad enzimática durante el desarrollo pueden ser un reflejo de la ingestión de colesterol y de sus niveles hepáticos si bien esta última condición no parece haber sido completamente demostrada (142). Sin embargo, la posible influencia del colesterol de la dieta no puede invocarse a la hora de explicar los cambios observados en la actividad reductasa de hígado de pollo, ya que los animales se encuentran sometidos a un mismo tipo de dieta desde el momento de la eclosión. En cambio, dichas variaciones podrian estar relacionadas con las observadas en la cantidad de colesterol esterificado, cuya cantidad por 100 mg de peso fresco y cuyo porcentaje respecto al total disminuyen marcadamente hacia las mismas fechas en que se da el aumento de la actividad reductasa. No obstante, no puede descartarse en modo alguno la necesidad apuntada anteriormente de proceder a la síntesis "de novo" de colesterol que parece ocurrir a la misma edad.

En cerebro, la actividad reductasa no muestra variaciones apreciables durante el periodo ensayado (1-16 dias). De nuevo en este órgano existe un cierto paralelismo con las variaciones de colesterol en cualquiera de sus formas de presentarse, así como con los cambios en el por-

centaje de formas libre y esterificado. En efecto, en cerebro de pollos de la misma edad el 95-100 % del colesterol se encuentra en forma libre, sin que sus niveles se afecten a lo largo del desarrollo postnatal. Resultados no publicados obtenidos en nuestro Departamento muestran que este elevado porcentaje de colesterol libre existe también durante la segunda mitad del desarrollo embrionario del pollo (cerebros de embriones de 10-21 días), si bien, en este caso, la cantidad total de colesterol libre sufre un fuerte incremento entre los días 12-18, estabilizándose hasta la eclosión (224). Ello explicaría los niveles relativamente altos, aunque poco variables, puestos de manifiesto en la actividad reductasa en cerebros de pollos recién nacidos. De entre otras actividades enzimáticas relacionadas solo la mevalonato cinasa de cerebro parece disminuir con la edad (225), lo cual estaría de acuerdo con los requerimientos menores respecto a la síntesis de colesterol en cerebro de pollos una vez finalizada la mielinización.

Los resultados que se tienen en ratas y ratones, únicos animales experimentados en este aspecto, son contradictorios, si bien parecen indicar que la actividad HMG-CoA reductasa de cerebro es inaccesible a la acción del colesterol de la dieta. En ratones Kandutsch y Saucier (144) estudiaron los cambios de la actividad enzimática y la capacidad de incorporación de acetato, observando que la primera disminuía marcadamente a partir del primer día de vida. En cerebro de rata, Aragon y col. (145) pusieron de manifiesto la existencia de dos máximos en la actividad reductasa, uno hacia los días 10-12 y otro hacia el día 20. Estos resultados difieren considerablemente de los encontrados por Ness y col. en el mismo origen, para quienes el máximo de la actividad aparece claramente en el día 3 de vida, disminuyendo marcadamente con posterioridad (146). Según estos últimos autores, la fecha de aparición del máximo de actividad reductasa

coincide con el comienzo del rápido crecimiento cerebral que ocurre en la mielinización, sin que el cambio de alimentación que tiene lugar en el destete produzca aumento de la actividad, como ocurría en hígado. Una explicación de este tipo sería perfectamente asimilable a nuestros resultados, ya que los niveles de actividad reductasa encontrados en cerebro de pollo recién nacido podrían ser suficientes para la síntesis del colesterol durante la fase final de la mielinización, siendo de esperar que los cambios más bruscos de la actividad tengan lugar durante la segunda mitad ó antes del desarrollo embrionario. De cualquier forma, la actividad reductasa cerebral debe ser muy superior en aquellos estadios del desarrollo en que se requiere una gran síntesis de colesterol, como es el caso de la mielinización. A este respecto, se ha observado también que la actividad reductasa de cerebro de ratas de 7 días es mucho mayor que la de ratas adultas, lo cual está de acuerdo con la velocidad de crecimiento del cerebro en ambos estados (226).

La actividad HMG-CoA reductasa intestinal ha sido mucho menos estudiada que la de otros órganos. En rata, se ha visto que la actividad específica es aproximadamente igual en animales de 30-50-70 días (115), edades en que a la alimentación es semejante a la del adulto. Sin embargo, no se tienen datos de ratas lactantes ni de otros animales. Nuestros resultados con pollos recién nacidos muestran una actividad muy pequeña, con cambios a lo largo de la edad que, en principio, podrían considerarse relacionados con las necesidades de colesterol, ya que no hay que olvidar que en animales mielinizados, el intestino es junto al hígado el lugar de máxima capacidad biosintética de colesterol. Hasta el momento desconocemos los valores de contenido en colesterol total, libre y esterificado en intestino de pollo durante el desarrollo postnatal, lo cual nos impide establecer la misma relación que en los órganos anteriores. No obstante, la forma de la curva de

actividad respecto a la edad es semejante a la de hígado, por lo cual podrían aplicarse las mismas consideraciones que las hechas en aquella ocasión. La actividad observada durante los primeros 5 días de vida contrasta con los resultados de hígado, si bien podría deberse a que, en general, la reductasa de intestino esta menos inhibida por el colesterol que la hepática.

De cualquier forma, la comparación de las variaciones observadas en la actividad HMG-CoA reductasa microsomal de hígado, cerebro y asa duodenal ponen de manifiesto que la enzima no está regulada de una manera coordinada. Mas bien, la actividad enzimática parece responder marcadamente a las necesidades fisiológicas de cada tejido respecto a la síntesis del colesterol, lo cual, por otra parte, está de acuerdo con el papel fundamental de la enzima en la regulación de la biosíntesis de este compuesto.

Efecto de la suplementación de colesterol sobre la actividad enzimática

Se ha mencionado anteriormente que el colesterol actúa como un potente inhibidor de la reductasa hepática de rata adulta. Teniendo esto en mente, se ha intentado conocer el efecto que tiene la suplementación de colesterol al 2 % a la dieta dada a los animales desde el momento en la eclosión, sobre los cambios exhibidos por la actividad enzimática a lo largo del desarrollo postnatal. En un trabajo ya citado McNamara y col. (142) demostraron que el aumento de la actividad hepática debido al destete natural puede observarse también, aunque menos acusado, cuando las ratas se sometieron a un destete adelantado hacia el día 16. Asimismo, si las ratas se mantenían con alimentación lactea durante los 28 primeros días

de vida, no aparecía el incremento de la actividad normalmente observado hacia el día 21. En nuestro caso, el incremento observado en pollos con alimentación estandar hacia el día 5 quedó completamente anulado en animales sometidos a una dieta rica en colesterol, manteniéndose la actividad en niveles mínimos durante todo el tiempo que duró el tratamiento.

Un efecto semejante se puso de manifiesto sobre la actividad reductasa duodenal, lo cual parece confirmar lo expresado anteriormente sobre el posible mecanismo de regulación de la enzima de este órgano, similar al de la enzima hepática. En cambio, la enzima de cerebro no se ve afectada por la suplementación de colesterol a la dieta, corroborándose en este caso de nuevo un mecanismo diferente responsable de la regulación de la reductasa cerebral.

Incorporación de ^{14}C -acetato

El acetato es uno de los sustratos mas comunmente utilizados para estudiar "in vivo" la biosíntesis del colesterol. La localización de la HMG-CoA reductasa en la secuencia metabólica, en el punto anterior a la síntesis del ácido mevalónico, hace que la incorporación de acetato sea un índice directo de la funcionabilidad de la enzima mencionada, y uno de los sistemas mas usados con fines comparativos frente a dicha actividad enzimática. Sin embargo, hay que mencionar que la medida de la radiactividad del ^{14}C -acetato incorporado en lípidos insaponificables por cortes de tejidos puede presentar ciertas dificultades derivadas de la penetración del acetato en las células y su activación a acetil-CoA, por una parte, y de la dilución del precursor en el interior de la célula, por otra. Los últimos datos que se tienen a este respecto parecen indicar que, a pesar de los inconvenientes citados, la utilización de acetato radiactivo por cortes de tejidos

es aún un método fiable para el estudio de la biosíntesis de sus derivados, entre ellos el colesterol, si bien los resultados deber ser interpretados con cierta prudencia (227).

En el caso que nos ocupa se ha estudiado la incorporación de acetato a lípidos insaponificables por cortes de hígado y por fragmentos de asa duodenal. Por las dificultades para la obtención de cortes reproducibles de cerebro de pollos de la edad en estudio nos vimos en la necesidad de prescindir de dicho órgano en el presente trabajo. En el primero de los organos estudiados, hígado, se han establecido las condiciones de trabajo idoneas para su realización, especialmente las referentes al grosor de los cortes y al tiempo de incubación habiéndose observado una mayor reproductibilidad de resultados y proporcionalidad respecto al peso total de órgano utilizado, cuando se emplean cortes de pequeño grosor.

En cuanto a la velocidad de incorporación de acetato en función de la edad de los animales, los resultados obtenidos son, en general, comparables con los de la actividad HMG-CoA reductasa. En pollos alimentados con dieta estandar, la capacidad de incorporación de acetato por cortes de hígado es minima hasta el día 4, aumentando fuertemente a partir de entonces y tendiendo a estabilizarse a partir del día 11. Como se recordará un cuadro completamente semejante se obtenía con las variaciones de la reductasa durante el mismo periodo lo cual parece corroborar la relación entre ambos tipos de variaciones y, fundamentalmente, el papel central de la reductasa en la biosíntesis del colesterol.

Particularmente interesantes parecen ser los resultados obtenidos con suplementación de colesterol a la dieta desde la eclosión, ya que en este caso el curso de la incorporación de acetato es semejante al

observado sin tal suplementación durante los primeros 7 días, anulándose a partir de este día la capacidad de incorporación por acción del colesterol. Si se compara este resultado con la anulación casi completa de la actividad reductasa y con los cambios en el contenido en colesterol podríamos deducir que el colesterol adicionado a la dieta no parece tener efecto sobre la incorporación de acetato por el hígado en tanto en cuanto aun existen proporciones considerables de colesterol esterificado en este órgano, siendo quizás suficiente la actividad residual de reductasa para explicar los niveles de incorporación de acetato que aun se observan en pollos de 7 días. No debemos olvidar a este respecto, que los niveles de actividad reductasa son en condiciones normales muy inferiores a los de otras enzimas relacionadas, por lo que puede bastar una actividad muy debil para permitir el funcionamiento, aunque no al máximo, de la ruta biosintética.

Un comportamiento semejante al hígado parece tener el asa duodenal, donde la incorporación de acetato sufre variaciones mas o menos semejantes a las exhibidas por la actividad reductasa, si bien, la disminución observada en esta última al aumentar la edad parece presentarse unos días antes o no ser al menos tan brusca en el caso de la incorporación de acetato. El efecto de la suplementación de colesterol a la dieta es tambien similar al descrito en hígado, aunque en asa duodenal parece ejercer a cualquier edad un efecto inhibitor de la capacidad de incorporación, siempre menos patente durante la primera semana de vida y mucho mas claro a partir del día 7.

En cualquier caso se pone de manifiesto de una manera clara un estrecho paralelismo entre las variaciones en la incorporación de sustrato y en la actividad HMG-CoA reductasa a lo largo de la edad, observán-

dose en cambio que el efecto del colesterol suplementado a la dieta no es tan patente sobre la incorporación como sobre la actividad reductasa durante la primera semana de vida, posiblemente por la intervención de otros factores como puede ser la proporción de colesterol esterificado presente en el tejido, especialmente en hígado, en animales de esa edad.

Cambios en la composición lipídica de las membranas microsomales durante el desarrollo postnatal

La biosíntesis de componentes moleculares de membrana es continua en la mayor parte de las células, independientemente de su estado de desarrollo ó de sus actividades. Gran proporción de esta actividad biosintética puede estar destinada a la división y /ó diferenciación celular y a la formación ó modificación de membranas existentes.

En mamíferos los cambios que transcurren desde la diferenciación celular a la madurez funcional van acompañadas de modificaciones específicas en las enzimas ligadas a membranas. Durante la división y diferenciación celular, la formación de membranas puede requerir una mayor parte de la actividad biosintética de las células, pero las células maduras y diferenciadas no muestran cambios netos en su contenido en membranas. Sin embargo, se ha demostrado que los componentes de membrana continuamente se están renovando y que cada uno de ellos presenta un "turnover" metabólico característico.

Teniendo en cuenta el interés que puede presentar el mejor conocimiento de la evolución de la membrana microsomal con vistas al esclarecimiento del mecanismo por el cual algunas enzimas de la biosíntesis del colesterol pueden verse reguladas, emprendimos el estudio de la com-

composición lipídica de estas membranas en distintos órganos de pollo recién nacido, así como de sus posibles modificaciones por efecto del propio colesterol adicionado a la dieta.

a) Niveles de colesterol

Los resultados obtenidos, muestran que en microsomas de hígado existe un descenso en los niveles de colesterol microsomal durante los cuatro primeros días de desarrollo postnatal que se corresponde con un descenso del colesterol total en el órgano completo (213). Posteriormente no se observan variaciones apreciables. La elevada relación colesterol/mg proteína en microsomas en el día de la eclosión, probablemente sea debida al aporte de colesterol procedente del saco vitelino a la membrana microsomal. Este aporte disminuiría gradualmente hasta el 4-5 día aproximadamente, días a partir de los cuales se puede considerar que el colesterol necesario para las membranas microsomales procedería en su mayor parte del sintetizado en los propios microsomas. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Boland y col. (171) en microsomas de músculo esquelético y cardíaco que muestran también diferencias apreciables entre los niveles de colesterol en embriones y pollos adultos.

En microsomas de asa duodenal, los niveles de colesterol total son algo superiores a los de hígado y de igual manera se observa un descenso significativo en su contenido, durante los primeros días de desarrollo postnatal.

En cerebro el contenido en colesterol microsomal es apreciablemente superior al de los otros órganos y a diferencia de estos se incrementan los valores desde el día de la eclosión hasta la segunda semana

de desarrollo postnatal, siendo especialmente elevados los cambios originados durante los últimos días. Por tanto si comparamos los tres órganos, se deduce claramente que la evolución del contenido en colesterol microsomal de cerebro durante el periodo estudiado es diferente y que en él no parece influir el aporte de colesterol procedente del saco vitelino.

b) Niveles de fosfolípidos

En cuanto a las determinaciones de fosfolípidos totales y de cada uno de los fosfolípidos mayoritarios se observa que en hígado tiene lugar un apreciable descenso de la relación fósforo lipídico/mg proteína durante los primeros días de desarrollo, para incrementar después de manera más lenta y gradual hasta alcanzar niveles semejantes a los del día de la eclosión.

Los valores de los fosfolípidos mayoritarios encontrados en microsomas de hígado así como sus cambios con la edad son muy semejantes a los obtenidos por otros autores (171) en microsomas de músculo esquelético de pollo. A pesar de las variaciones indicadas, es preciso señalar que el porcentaje relativo de los diferentes fosfolípidos se mantiene prácticamente constante durante los catorce días de desarrollo, exceptuando el gran descenso del % de esfingomielinas durante los cuatro primeros días.

En asa duodenal, los niveles de fosfolípidos son del mismo orden que en microsomas de hígado, excepto en el día de la eclosión que son inferiores en asa duodenal y de forma apreciable.

Las variaciones observadas en estos fosfolípidos totales

durante el desarrollo son análogas a las encontradas en microsomas de hígado, con un descenso menos acusado durante los cuatro primeros días que se debe exclusivamente a un descenso en el contenido microsomal de fosfatidiletanolamina y esfingomielinina que queda reflejado en un fuerte descenso de sus porcentajes relativos.

En microsomas de cerebro, el contenido en fosfolípidos totales es bastante superior al encontrado en hígado y asa duodenal. En cuanto a la composición en fosfolípidos individuales los porcentajes de fosfatidilcolina se mantienen muy semejantes a los de hígado y asa duodenal, mientras que el fosfatidilinositol se encuentra en porcentajes apreciablemente superiores. Resumiendo, podemos decir que las membranas microsomales hígado, asa duodenal y cerebro presentan una composición lipídica diferente; las variaciones que tienen lugar en dicha composición durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal en pollo son muy parecidas en microsomas de hígado y asa duodenal, siendo especialmente importantes los cambios producidos en los primeros días después de la eclosión. Los cambios globales que se producen en microsomas de cerebro son bastante diferentes.

c) Relación molar colesterol/fosfolípidos

Los resultados obtenidos del análisis de colesterol y fosfolípidos totales de extractos lipídicos de membranas microsomales pueden ser expresados en términos de la relación molar colesterol/fosfolípidos. Dicha relación es especialmente importante por reflejar el grado de "fluidez" de las membranas. En este sentido, Kutchai y col. (170) han descrito que los cambios de microviscosidad que ocurren en la membrana están directamente relacionados con los cambios en el contenido en colesterol de la misma.

Nuestros resultados muestran un ligero descenso de la relación molar colesterol/fosfolípidos en microsomas de hígado durante los catorce primeros días de desarrollo, lo que supondría un pequeño descenso de la viscosidad de la membrana ó, lo que es igual, un pequeño incremento de fluidez durante el periodo estudiado. Variaciones del mismo orden han sido obtenidas también por otros autores (170) en la relación molar de microsomas de músculo esquelético y extractos lipídicos de fracciones subcelulares de corazón de embriones y pollos adultos.

En asa duodenal, los microsomas presentan una relación molar con valores superiores a los encontrados en hígado, lo que supondría un mejor grado de fluidez de estas membranas. En el periodo ensayado se observan fluctuaciones en los valores de dicha relación molar.

En microsomas de cerebro, prácticamente no se modifica la relación molar y sus valores son aproximadamente del mismo orden que los encontrados en hígado. También en este órgano se observa claramente como se mantiene constante la "fluidez" de la membrana microsomal durante los catorce días del desarrollo postnatal del pollo.

Por tanto, podemos concluir que tienen lugar cambios significativos aunque pequeños en la composición lipídica de membranas microsomas de hígado de pollo durante los primeros catorce días de desarrollo postnatal, mientras que estos cambios son más pequeños en asa duodenal y mínimos en cerebro.

Por otra parte, comparando los resultados obtenidos en la actividad HMG-CoA reductasa durante las dos primeras semanas de vida y el grado de "fluidez" de la membrana microsomal a la que la enzima está ligada, podemos observar que no existe una clara correlación entre los cambios

de la actividad enzimática en hígado y asa duodenal, con los apreciados en la composición lipídica de los microsomas. Sin embargo, no puede descartarse una relación de este tipo en las distintas fracciones submicrosomales. En este sentido, otros autores (170) han comprobado una correlación entre otra enzima microsomal, la ATP asa implicada en el transporte de Ca^{2+} y la composición en fosfolípidos de determinadas subfracciones microsomales. Así mismo, el descenso observado entre los días 4-10 en la proporción de colesterol esterificado, forma que contribuye a una mayor rigidez de la membrana microsomal (169, 179) significaría un aumento de la fluidez de la membrana que podría contribuir al aumento observado durante los mismos días en la actividad HMG-CoA reductasa.

Un efecto semejante puede observarse en asa duodenal mientras que en cerebro ni la actividad reductasa ni la relación colesterol/fosfolípidos cambian con la edad, manteniéndose ambos parámetros constantes durante el periodo ensayado.

Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la composición lipídica de microsomas

Son numerosos los estudios que se han realizado durante los últimos años, orientados a explicar el efecto de una dieta rica en colesterol sobre la HMG-CoA reductasa. Los resultados obtenidos muestran una correlación inversa entre la concentración de colesterol o sus ésteres en el hígado de rata y la actividad HMG-CoA reductasa ó la actividad colesterogénica (118, 140, 213, 228).

Con objeto de lograr un mejor conocimiento del mecanismo por

el cual el colesterol actúa sobre la reductasa, hemos estudiado los cambios lipídicos originados en la membrana microsomal de hígado, asa duodenal y cerebro de pollo por la suplementación de colesterol a la dieta. Los resultados obtenidos muestran que existe un fuerte y rápido incremento de colesterol en microsomas de hígado, que alcanza ya su valor máximo el cuarto día de tratamiento y prácticamente no se modifica después. La relación molar colesterol/fosfolípidos aumenta también claramente durante la primera semana de vida y en cualquier caso se mantiene muy por encima del valor observado en microsomas de animales controles, lo cual se traduce en una disminución de la fluidez de la membrana debida a la suplementación de colesterol. Esta disminución estaría de acuerdo con el descenso de la actividad HMG-CoA reductasa puesto de manifiesto por el mismo tratamiento, lo cual sugiere que el mecanismo por el cual el colesterol ejerce un efecto negativo sobre la reductasa sea a través de alteraciones en la composición lipídica microsomal.

En el mismo sentido, hay que señalar que todo el colesterol incorporado sobre los microsomas, el 50% lo hace en forma libre y el resto en forma esterificada, lo cual se interpreta como una activación de alguna de las enzimas implicadas en la esterificación del colesterol, probablemente la acil-CoA: colesterol aciltransferasa, (ACAT) cuya actividad se ha descrito que se ve duplicada en hígado de rata por la inyección intravenosa de un análogo fotosensible del colesterol (182). Este aumento de la proporción de colesterol esterificado contribuiría también al descenso de la fluidez microsomal (169, 179) y por tanto a la inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa. En este sentido hemos de tener en cuenta que son varios los autores que atribuyen un papel fundamental a los ésteres de colesterol sobre la regulación de la reductasa (229, 230) sin que se haya propuesto un mecanismo de acción de los mismos.

Un efecto semejante, aunque menos acusado se observa en la relación molar colesterol/fosfolípidos de microsomas de asa duodenal por efecto de la suplementación de colesterol. La menor inhibición de la actividad reductasa puesta de manifiesto en este órgano, frente a los animales controles si se compara con el mismo fenómeno en hígado, estaría relacionada con el efecto menos patente observado a nivel de la fluidez de la membrana.

En microsomas de cerebro, la ausencia de cambios en la actividad reductasa por efecto del tratamiento está estrechamente correlacionada con la falta también de cambios apreciables en el grado de fluidez de la membrana microsomal.

Por tanto, los tres órganos estudiados se comportan de manera diferente en cuanto a modificación de su composición lipídica y de su actividad HMG-CoA reductasa frente a la suplementación de colesterol en la dieta, pero en todos ellos se observa siempre una estrecha correlación en los cambios de "fluidez" de la membrana y los cambios de actividad reductasa. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en microsomas de hígado de rata por Sabine y col. (212) quienes a partir de representaciones de Arrhenius para la HMG-CoA reductasa deducen un incremento en el valor de la energía de activación de la reductasa que explicaría la inhibición de su actividad por efecto del colesterol de la dieta.

Los resultados expuestos anteriormente inducen por tanto a pensar que el mecanismo responsable de la regulación de la HMG-CoA reductasa por el colesterol sea una alteración en la "fluidez" de la membrana, inducida por su suplementación en la dieta.

VI CONCLUSIONES

1.- Se han estudiado las condiciones óptimas para la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa microsomal en diferentes órganos de pollo recién nacido mediante un método radioisotópico basado en la cuantificación del ácido mevalónico formado en la reacción en estudio.

2.- Se ha establecido la concentración óptima de los diferentes "protectores" de la actividad enzimática usados durante el aislamiento de microsomas sin que se produzca en ningún caso interferencia de los mismos sobre el sistema de determinación de proteínas.

3.- Se ha estudiado la estabilidad de la reductasa microsomal, habiéndose demostrado que no existe activación de la misma por un proceso de defosforilación catalizado por una fosfatasa. La conservación de la actividad a 4°C es independiente de la presencia de ion F^- .

4.- La HMG-CoA reductasa hepática no es apenas detectable hasta el día 5 de vida del pollo, incrementándose fuertemente a partir de ese día y tendiendo a estabilizarse hacia los días 9-10. La enzima de cerebro no presenta variaciones apreciables en los márgenes de días estudiados (1-16) siendo prácticamente constante y presentando niveles inferiores a los alcanzados en hígado a partir de los días 7-8. La actividad reductasa de asa duodenal aumenta desde el primer día de vida hasta el día 7, manteniéndose hasta el día 11 y disminuyendo después. En cualquier caso sus niveles son muy inferiores a los existentes en cerebro.

5.- La suplementación de colesterol al 2 % a la dieta con la que se alimentan los pollos desde la eclosión anula el aumento experimentado con la edad por la reductasa de hígado y de asa duodenal, si bien no

afecta a la actividad de la enzima de cerebro.

6.- La incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables por cortes de hígado y fragmentos de asa duodenal sigue un cuadro muy parecido al de la reductasa a lo largo del desarrollo postnatal del pollo.

7.- La suplementación de colesterol a la dieta modifica la capacidad de incorporación de acetato por cortes de hígado o fragmentos de asa duodenal en el mismo sentido en que lo hacía sobre la reductasa, si bien en este caso su efecto es patente solo a partir del día 7 de vida.

8.- Se ha estudiado la composición lipídica de los microsomas de hígado, cerebro y asa duodenal durante las dos primeras semanas de vida. En los microsomas hepáticos el colesterol total sufre una ligera disminución en los primeros días, manteniéndose este nivel el resto del tiempo.

Los porcentajes de colesterol libre y esterificado no varían con la edad manteniéndose siempre superiores los de colesterol libre. La suplementación de colesterol a la dieta origina un fuerte incremento del colesterol total en microsomas hepáticos, incorporándose a los mismos un 50 % en forma libre y otro 50 % en forma esterificado. Como consecuencia de lo anterior, los porcentajes de ambas formas tienden a igualarse.

9.- En los microsomas de hígado no se observaron variaciones apreciables a lo largo del desarrollo postnatal en la cantidad de fósforo lipídico total expresado por mg de proteína, ni en la cantidad de cada uno de los fosfolípidos mayoritarios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol. La adición de colesterol

a la dieta no afecta a la cantidad de fosfolípidos totales, si bien parece aumentar ligeramente la proporción de fosfatidilcolina y disminuir la de fosfatidiletanolamina.

10.- La relación molar colesterol/fosfolípidos tiende a disminuir a lo largo de la edad en microsomas de hígado. La suplementación de colesterol a la dieta incrementa fuertemente esta relación molar desde el primer día de tratamiento, tendiendo a estabilizarse a partir del día 4, lo cual supone un fuerte descenso del grado de "fluidez" de la membrana microsomal.

11.- En microsomas de cerebro, la cantidad de colesterol total se incrementa gradualmente con la edad, siendo mayor el porcentaje de colesterol libre que de esterificado, salvo en el día 4 en que hay casi un 50 % de cada forma. La adición de colesterol a la dieta solo produce un ligero incremento del colesterol total respecto a los controles. Este incremento se debe al colesterol libre, cuya cantidad aumenta alcanzando valores superiores a la suma del existente más el incorporado de la dieta.

12.- La cantidad total de fósforo lipídico en microsomas de cerebro se incrementa con la edad debido principalmente al aumento de los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, si bien los porcentajes se mantienen prácticamente constantes. El colesterol suplementado a la dieta no afecta ni el fósforo lipídico total ni a ninguno de los fosfolípidos estudiados.

13.- La relación molar colesterol/fosfolípidos en microsomas de cerebro no se modifica ni a lo largo de la edad ni por el colesterol de la dieta, salvo un pequeño incremento observado durante los primeros días de tratamiento.

14.- El contenido en colesterol total de los microsomas de asa duodenal no experimenta variaciones apreciables con la edad, siendo el porcentaje de forma libre superior siempre al esterificado. La suplementación de colesterol a la dieta origina un cierto incremento en la cantidad de colesterol total en estos microsomas, tendiendo a hacer más constante los porcentajes de libre y esterificado a lo largo de la edad.

15.- El fósforo lipídico total de microsomas duodenales no varía prácticamente durante la primera semana, incrementándose ligeramente después. Este incremento corresponde fundamentalmente a los niveles de fosfatidilcolina. La distribución porcentual de cada fosfolípido se mantiene constante a lo largo de la edad ensayada. El colesterol de la dieta no presenta un efecto apreciable sobre ninguno de los fosfolípidos estudiados, ni, por tanto, sobre el total de ellos.

16.- La relación molar colesterol / fosfolípidos presenta pequeñas fluctuaciones durante el desarrollo postnatal. La dieta rica en colesterol incrementa ligeramente esta relación molar, disminuyendo así la fluidez de la membrana de los microsomas de asa duodenal.

Conclusión final.

La comparación de las variaciones observadas a lo largo del desarrollo postnatal en la actividad HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado, cerebro y asa duodenal pone de manifiesto que la enzima no está regulada de una manera coordinada sino que parece responder marcadamente a las necesidades fisiológicas de cada tejido respecto a la síntesis de colesterol, lo cual corrobora el papel fundamental de esta enzima en la regulación del proceso metabólico en estudio.

Por otra parte, la relación existente entre la inhibición de la HMG-CoA reductasa de hígado y asa duodenal debida al colesterol de la dieta y la disminución del grado de fluidez de la correspondiente membrana microsomal (incremento de la relación molar colesterol / fosfolípidos) sugiere que el mecanismo de acción del colesterol en la regulación de la reductasa en estos organos se lleva a cabo mediante alteración de la "fluidez" de la membrana microsomal a la cual se encuentra ligada la enzima. En este mismo contenido habria que señalar que en cerebro la no modificación de la actividad reductasa por el colesterol se ve correspondida por el mantenimiento del grado de "fluidez" de la membrana microsomal, corroborando de este modo la distinta funcionabilidad enzimática de los diferentes órganos del animal de acuerdo con sus peculiaridades fisiológicas.

VII BIBLIOGRAFIA

1. - CHEVALLIER, F. y LUTTON, C. 1972. Mouvements des stérols dans le tube digestif d'un rat. Absorption du cholestérol de synthèse. *Biochim. Biophys. Acta* 274:382.
2. - SKLAND, D., DAHAN, M., BUDOWSKI, P. y HURWITZ, S. 1977. Differential absorption of endogenous and exogenous cholesterol in the chick as affected by dietary oil level and phytosterols. *J. Nutr.* 107: 1996.
3. - LUTTON, C. y BROT-LAROCHE, E. 1979. Biliary cholesterol absorption in normal and L-thyroxin-fed rats. *Lipids* 14: 441.
4. - HATCH, F. T., ASO, Y., HAGOPIAN, L. M. y RUBINSTEIN, J. L. 1966. Biosynthesis of lipoprotein by rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* 241: 1655.
5. - VODOVAR, N., FLANZY, J. y FRANCOIS, A. C. 1969. The chylomicrons of the intestinal absorptive cell: site of formation, fine structure and function in the mechanisms of long chain fatty acid absorption. *Ann. Biol. Anim.* 9: 219.
6. - CHEVALLIER, F. y VYAS, M. 1963. Les origines du cholestérol du chyle. Mise en évidence à l'aide de la méthode des indicateurs nucléaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44: 253.
7. - CLEMENT, J. 1961. Les lipides intestinaux et fécaux chez le rat soumis pendant de longues périodes à un régime lipidoprive. *Ach. Sci. Physiol.* 15: 345.
8. - DIETSCHY, J. M. y WILSON, J. D. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. *N. Engl. J. Med.* 282: 1179.
9. - WILSON, J. D. y REINKE, R. T. 1968. Transfer of locally synthesized cholesterol from intestinal wall to intestinal lymph. *J. Lipid. Res.* 9: 85.
10. - LUTTON, C., MATHE, D. y CHEVALLIER, F. 1973. Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert chez le rat. VI: Influence de la ligature du cholédoque et de l'ingestion d'acides biliaires ou de cholestyramine. *Biochim. Biophys. Acta* 306: 483.

- 11.- MATTSON, F. H., JANDACEK, R. J. y WEBB, M. R. 1976. The effect of a nonabsorbable lipid, sucrose polyester, on the absorption of dietary cholesterol by the rat. *J. Nutr.* 106: 747.
- 12.- SIMONS, L. A., GIBSON, J. C., PAINO, C., HOSKING, M. BULLOK, J. y TRIM, J. 1978. The influence of a wide range of absorbed cholesterol on plasma cholesterol levels in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 1334
- 13.- HEGSTED, D. M., McGANDY, R. M., MYERS, M. L. y STARE, F. J. 1968. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Amer. J. Clin. Nutr.* 17: 281.
- 14.- KEYS, A., ANDERSON, J. y GRANDE, F. 1965. Serum cholesterol response to changes in the diet. II. The effect of cholesterol in the diet. *Metabolism* 14: 747.
- 15.- WILSON, J. D. 1964. The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady state in the rat; the influence of dietary cholesterol. *J. Lipid. Res.* 5: 409.
- 16.- DIETSCHY, J. M. y WILSON, J. D. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. *N. Engl. J. Med.* 282: 1128.
- 17.- WILSON, J. D. 1962. Influence of dietary cholesterol on excretion of cholesterol-¹⁴C by the rat *Amer. J. Physiol.* 202: 1073.
- 18.- CHEVALLIER, F. and LUTTON, C. 1966. Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert chez le rat. I. Méthodes et résultats obtenus dans le cas d'un régime semi-synthétique témoin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48: 507.
- 19.- LUTTON, C., y CHEVALLIER, F. 1972. Analyses des stérols des contenus digestifs et des fèces du rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 260: 133.
- 20.- DORFMAN, R. I. y UNGAR, F. 1965. En: *Metabolism of steroid hormones.* pp. 123-213. Academic Press, New York.
- 21.- BHATTACHARYYA, A. K., CONNOR, W. E. y SPECTOR, A. A. 1972. Excretion of sterols from the skin of normal and hypercholesterolemic humans. Implication for sterol balance studies. *J. Clin. Invest.* 51: 2060.

22. - TRISCARI, J., HAMILTON, J. G. y SULLIVAN, A. C. 1978. Comparative effect of saturated and unsaturated lipids on hepatic lipogenesis and cholesterogenesis "in vivo" in the meal-fed rat. *J. Nutr.* 108: 815.
23. - WILSON, J. D. y SIPERSTEIN, M. D. 1959. Effect of saturated and unsaturated fed on fecal excretion of end products of cholesterol-4-¹⁴C metabolism in the rat. *Amer. J. Physiol.* 196: 596.
24. - SHEFER, S., HAUSER, S., BEKERSKY, I. y MOSBACH, E. H. 1969. Feedback regulation of bile acids biosynthesis in the rat. *J. Lipid. Res.* 10: 646.
25. - GINTER, E. 1975. Ascorbic acid in cholesterol and bile acid metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258: 410.
26. - UCHIDA, K., NOMURA, Y., KADOWAKI, M., TAKEUCHI, N. y YAMAMIRA Y. 1977. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 27:193.
27. - SKALAND, D. y BURDOWSKI, P. 1979. Cholesterol metabolism in the liver and intestine of the chick. effect of dietary cholesterol, taurocholic acid and cholestyramine. *Lipids.* 14: 386.
28. - QUINTAO, E., GRUNDY, S. M. y AHRENS, E. H. 1971. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J. Lipid. Res.* 12: 233.
29. - GRUNDY, S. M., AHRENS, E. H. y MIETTINEN, T. A. 1965. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J. Lipid. Res.* 6: 397.
30. - MIETTINEN, T. A., AHRENS, E. H. GRUNDY, S. M. 1965. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J. Lipid Res.* 6: 411.
31. - GANGL, A. y OCKNER, R. K. 1975. Intestinal metabolism of lipids and lipoproteins. *Gastroenterology* 68:167.
32. - FAERGEMAN, O. y HAVEL, R. J. 1975. Metabolism of cholesterol esters of rat very low density lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 55: 1210

- 33.- JACKSON, R. L., MORRISET, J. F. y GOTTO, A. M. 1976. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Res.* 56: 259.
- 34.- EISENBERG, S. y LEVY, R. I. 1975. Lipoproteins and lipoprotein metabolism. En: *Hypolipidemic agents* (Ed.: D. Kritchevsky) p. p. 191-213. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York
- 35.- BROWN, M. S. y GOLDSTEIN, J. L. 1976. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *N. Engl. J. Med.* 294: 1386.
- 36.- BROWN, M. S. y GOLDSTEIN, J. L. 1976. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191: 150
- 37.- SCHATZ, C. C., HALLORAN, L. G., VLAHCEVIC, Z. R. GREGORY, D. H. y SWELL, L. 1978. High and low density lipoprotein metabolism in man: Preferential utilization of HDL free cholesterol by the liver for biliary cholesterol secretion. *Science* 200: 62.
- 38.- HALLORAN, L. G., SCHWARTZ, C. C., VLAHCEVIC, Z. R., NISMAN, R. M. y SWELL, L. 1978. Evidence for high-density lipoprotein-free cholesterol as the primary precursor for bile-acid synthesis in man. *Surgery* 84:1.
- 39.- STEIN, O., GOREN, R. y STEIN, Y. 1977. Removal of cholesterol from fibroblast and smooth muscle cells in culture in the presence and absence of cholesterol esterification in the medium. *Biochim. Biophys. Acta* 529: 309.
- 40.- ROHEIM, P. S., RACHMILEWITZ, D., STEIN, O. y STEIN, Y. 1971. Metabolism of iodinated high density lipoproteins in the rat. I. Half-life in the circulation and uptake by organs. *Biochim. Biophys. Acta* 248: 315
- 41.- EISENBERG, S., WINDMUELLER, H. G. y LEVY, R. I. 1973. Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J. Lipid. Res.* 14: 446.
- 42.- STEIN, O., STEIN, Y. y EISENBERG, S. 1973. A radioautographic study of the transport of ¹²⁵I-labeled serum lipoproteins in rat aorta. *Z. Zellforsch* 138: 223

43. - HAGERMANN, J. S. y GOULD, R. G. 1951: The "in vitro" interchange of cholesterol between plasma and red cells. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 78:329
44. - D'HOLLANDER, F. y CHEVALLIER, F. 1972. Movement of cholesterol "in vitro" in rat blood and quantitation of the exchange of free cholesterol between plasma and erythrocytes. J. Lipid Res. 13, 733.
45. - GACHELIN, G. 1980. Le cholesterol: un materiau pour les cellules. Recherche 11: 725.
46. - GOLDSTEIN, J. L., DANA, S. E. y BROWN, M. S. 1974. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. Proc. Nat. Acad. Sic. U.S. 71: 4288
47. - KAYDEN, H. J., HATAM, L. y BERATIS, N. G. 1976. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and the esterification of cholesterol in human long term lymphoid cell lines. Biochemistry 15: 521.
48. - GOLDSTEIN, J. L. y BROWN, M. S. 1975. Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism and atherosclerosis. Arch. Pathol. Lab. Med. 99: 181
49. - BALASUBRAMANIAM, S., GOLDSTEIN, J. L., FAUST, J. R., BRUNS-CHEDE, G. Y. y BROWN, M. S. 1977. Lipoprotein-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol ester metabolism in the adrenal gland of the rat. J. Biol. Chem. 252: 1771
50. - GOLDSTEIN, J. L. y BROWN, M. S. 1976. En: Current topics in cellular regulation (Horecker, B. L. and Stadtman, E. R., eds.). Voll. 11, pp. 147-181, Academic Press, New York.
51. - GOULD, R. G. y COOK, R. P. 1958. The metabolism of cholesterol in the animal organism. En "Cholesterol" (Ed: R. P. Cook), pp. 237-307, Academic Press, New York.
52. - TOMKINS, G. M. y CHAIKOFF, I. L. 1952. Cholesterol synthesis by liver. I. Influence of fasting and of diet. J. Biol. Chem. 196: 569.

53. - HUFF, J. W., GILFILLAN, J. L. y HUNT, V. M. 1963. Effect of cholestyramine, a bile acid binding polymer on plasma cholesterol and fecal bile acid excretion in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 114: 352.
54. - CHEVALLIER, F. y LUTTON, C. 1973. The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol.* 242: 61
55. - LUTTON, C. y CHEVALLIER, F. 1976. Coefficient d'absorption du cholestérol alimentaire, paramètre fondamental de l'équilibre dynamique du cholestérol chez le rat. *Biomédecine* 24: 205.
56. - CHEVALLIER, F. y MAGOT, T. 1975. Evidence of major role of the intestine in cholesterol synthesis in the adult mole rat. *Experientia* 31: 627.
57. - DIETSCHY, J. M. 1968. The role of bile salts in controlling the rate of intestinal cholesterologenesis. *J. Clin. Invest.* 47: 286.
58. - SHEFER, S., HAUSER, S., LAPAR, V. y MOSBACH, E. H. 1973. Regulatory effects of dietary sterols and bile acids on rat intestinal HMG-CoA reductase. *J. Lipid. Res.* 14: 400
59. - SWANN, A. y SIPERSTEIN, M. D. 1972. Distribution of cholesterol feedback control in the guinea pig. *J. Clin. Invest.* 51: 95
60. - SUGANO, M., FUJISAKI, Y. y IDE, T. 1980. Dietary regulation of intestinal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rats. 22nd Int. Conference Biochem. Lipids. A 11.
61. - DAVISON, A. N. 1965. Brain sterol metabolism. *Adv. Lipid Res.* 3: 171.
62. - CUZNER, M. L., DAVISON, A. N. y GREGSON, N. A. 1965. Chemical and metabolic studies of rat myelin in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 122:86
63. - O'BRIEN, J. S. 1967. Cell membranes composition, structure and function. *J. Theor. Biol.* 15: 307.
64. - ADAMS, C. W. M. y DAVISON, A. N. 1959. The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. *J. Neurochem.* 4: 282.

- 65.- CLARENBURG, R. STEINBERG, A. B., ASLING, J. H. y CHAIKOFF, I. L. 1966. Development of hydrolytic cholesterol esterase activity in rat brain. *Biochemistry* 5, 2433.
- 66.- HINSE, C. H. y SHAH, S. N. 1971. Desmosterol reductase activity of rat brain during development. *J. Neurochem.* 18: 1989
- 67.- VOLPE, J. J., HENNESSY, S. W. Y WONG, T. 1978. Regulation of cholesterol ester synthesis in cultured glial and neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 528: 424
- 68.- VOLPE, J. J. y HENNESSY, S. W. 1977. Cholesterol biosynthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cultured glial and neuronal cells. Regulation by lipoprotein and by certain free sterols. *Biochim. Biophys. Acta* 486: 408.
- 69.- ETO, Y. y SUZUKI, K. 1972. Cholesterol esters in developing rat brain. *Enzymes of cholesterol ester metabolism.* *J. Neurochem.* 19: 117.
- 70.- ADLERSBERG, D., SCHAEFER, L. E., STEINBERG, A. G. y WANG, C. I. 1956. Age, sex, serum lipids, and coronary atherosclerosis, *J. Amer. Med. Ass.* 162: 619.
- 71.- CARLSON, L. A., FROBERG, S. O. y NYE, E. R. 1968. Effect of age on blood and tissue lipid levels in the male rat. *Gerontology.* 14: 65.
- 72.- KRICHEVSKY, D. 1978. How aging affects cholesterol metabolism. *Posgra. Med.* 63: 133.
- 73.- ROTHBLAT, G. H. y KRITCHEVSKY, D. 1968. The metabolism of free and esterified cholesterol in tissue culture cells; A review. *Exp. Mol. Pathol.* 8: 314.
- 74.- ROTHFELD, B., PARE, W. P., VARADY, A., ISOM, K. E. y KARMEN A. 1973. The effects of environmental stress on cholesterol synthesis and metabolism. *Biochem. Med.* 7: 292
- 75.- CONNOR, W. E. y LIN, D. S. 1976. *J. Lipid Res.* 8: 558

76. - CONNOR, W. E., OSBORNE, J. W. y MARION, W. L. 1965. Incorporation of plasma cholesterol -4-¹⁴C into egg yolk cholesterol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118:710
77. - TSUJI, F. I., BRIN, M. y WILLIAMS, H. H. 1955. Lipide phosphorus and cholesterol changes in the hen egg during incubation. Arch. Biochem. Biophys. 56:290.
78. - GOODRINGDE, A. G. 1968. Conversion of (U-¹⁴C) glucose into carbon dioxide, glycogen cholesterol and fatty acids in liver slices from embryonic and growing chicks. Biochem. J. 108: 655
79. - HALEVY, S. y GEYER, R. P., 1961. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108:6
80. - CAMERINO, P. W. y WRIGHT, L. D. 1962. The biosynthesis of cholesterol in the developing chick embryo. J. Lipid Res. 3: 416
81. - STOKER, W. M., FISH, W. A. y HICKEY, F. C. 1953. Metabolism of cholesterol in the chick embryo. The synthesis of cholesterol. J. Biol. Chem. 200: 683.
82. - CONNOR, W. E., JOHNSTON, R. y LIN, D. S. 1969. Metabolism of cholesterol in the tissue and blood of the chick embryo. J. Lipid. Res. 10:338.
83. - PEARCE, J. 1977. Some differences between avian and mammalian biochemistry. Inter. J. Biochem. 8: 269.
84. - GREENGARD, O. y THORNDIKE, J. 1974. Changing enzyme patterns in chick organs during development. Enzyme 17:333
85. - FREEMAN, B. M. 1969. The mobilization of hepatic glycogen in Gallus domesticus at the end of incubation. Comp. Biochem. Physiol. 28: 1169
86. - GOMEZ CAPILLA, J. A., MACARULLA, J. M., MARTIN-ANDRES, A. y OSORIO, C. 1975. Evolution of the liver lipids during the embryonic and postnatal periods of Gallus domesticus. Rev. Esp. Fisiol. 31:177.
87. - DEUEL, H. J. 1955. The Lipids. Vol. II. Biochemistry. Digestion, absorption, transport and storage. New York: Interscience Pubs. pp. 948

- 88.- TEEKELL, R. A., BREIDNESTEIN, C. P. y WATTS, A. B. 1975. Cholesterol metabolism in the chicken. *Poultry Sci.* 54: 1036
- 89.- HO, K. J. 1976. Cholesterol contents of various tissues of chickens with exogenous or endogenous hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 187.
- 90.- HO, K. J. y TAYLOR, C. B. 1968. Comparative studies on tissue cholesterol. *Arch. Pathol.* 122: 585.
- 91.- KIM, D. N., LEE, K. T., REINER, J. M. y THOMAS, W. A. 1974. Restraint of cholesterol accumulation in tissue pools associated with drastic short-term lowering of serum cholesterol levels by clofibrate or cholestyramine in hypercholesterolemic swine. *J. Lipid Res.* 15: 326.
- 92.- CHOBANIAN, A. V., HOLLANDER, L. W. SULLIVAN, M. y COLOMBO, M. J. 1962. Body cholesterol metabolism in man. I. The equilibration of serum and tissue cholesterol. *J. Clin. Invest.* 41:1732
- 93.- SRERE, P. A., CHAIKOFF, I. L., TREITMAN, S. S. and BURSTEIN, L. S. 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.* 182: 629
- 94.- WORCESTER, N. A., BRUCKDORFER, K. R. y YUDKIN, J. 1975. Effect of dietary sucrose and dietary cholesterol on hyperlipidemia and atherosclerosis in white Leghorn cockerels (Gallus domesticus). *Proc. Nutr. Soc.* 34: 81A.
- 95.- HEVIA, P. y VISEK, W. J. 1979. Dietary Protein and plasma cholesterol in chickens. *J. Nutr.* 109:32
- 96.- HO, K. J., LAWRENCE, W. D., LEWIS, L. A., LIN, L. B. y TAYLOR, C. B. 1974. Hereditary hyperlipidemia in nonlaying chickens. *Arch. Pathol.* 98: 161.
- 97.- SKLAN, D., BUDOWSKI, P. y HURWITZ, S. 1974. Effect of soy sterols on intestinal absorption and secretion of cholesterol and bile acids in the chick. *J. Nutr.* 104: 1086.
- 98.- GODFREY, J. C. LUTTINGER, J. R., TAYLOR, H. D. y SANHYEZA, G. M. 1976. Dietary plant sterol-induced reduction of egg yolk cholesterol in the chicken. *Nutr. Rep. Int.* 13: 263.

- 99.- HWANG, E. C., GRIMMINGER, P. y FISHER, H. 1975. Effect of anti-hypercholesterolemic substances (AHS) on liver vitamin A activity in normo- and hypercholesterolemic chickens. *Nutr. Rep. Int.* 11:185.
- 100.- WOODS, J. E. y PODCZASKI, E. S. 1974. Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24: 413.
- 101.- KALLIECHARAN, R. y HALL, B. K. 1974. A developmental study of the levels of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone circulating in plasma of chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24: 364.
- 102.- KALLIECHARAN, N. R. y HALL, B. K. 1976. A developmental study of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone in the adrenal glands of the embryonic chick. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30:404.
- 103.- BEYTIA, E. D. y PORTER, J. W. 1976. Biochemistry of polyisoprenoid: biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 113
- 104.- DECKER, K. y BARTH, C. 1973. Compartmentation of the early steps of cholesterol biosynthesis in mammalian liver. *Mol. and Cell. Biochem.* 2: 179
- 105.- RAMACHANDRAN, C. K. y SHAH, S. N. 1977. Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 28: 751
- 106.- EDMOND, J. y POPJAK, G. 1973. Transfer of carbon atoms from mevalonate to n-fatty acids. *J. Biol. Chem.* 249:66
- 107.- SHERE, P. A., CHAIKOFF, O. L. TREITMAN, S. S. y BURSTEIN, L. S. 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.* 182: 629
- 108.- SIPERSTEIN, M. D. 1970. Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2:74
- 109.- MCNAMARA, D. J. y RODWELL, V. W. 1972. Regulation of "Active isoprene" biosynthesis. In *Biochemical regulatory mechanisms in Eukaryotic cell.* (Eds: E. Kun y s. Grisola), p. 205, Wiley, New York.
- 110.- BERNDT, J., HEGARDT, F. G. BOVE, J., GAUMERT, R. STILL, J. y CARDO, M. T. 1976. Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in vitro. *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.* 357: 1277

- 111.- RODWELL, V. W., MCNAMARA, D. J. y SHAPIRO D. J. 1973. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Adv. Enzymol.* 38: 373.
- 112.- HIGGINS, M. y RUDNEY, H. 1973. Regulation of rat liver β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA reductase activity by cholesterol. *Nature. New. Biol.* 246:60.
- 113.- EDWARDS, P. A., MUROYA, A. H. y GOULD, R. G. 1972. In vivo demonstration of circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *J. Lipid. Res.* 7:396.
- 114.- SHEFER, S., HAUSER, S., LAPAR, V. y MOSBACH, E. H. 1972. Diurnal variation of HMG-CoA reductase activity in rat intestine, *J. Lipid. Res.* 13:371
- 115.- SHEFER, S., HAYSER, S., LAPAR, V. y MOSBACH, E. H. 1972. HMG-CoA reductase of intestinal mucosa and liver of the rat. *J. Lipid. Res.* 13: 402.
- 116.- HELLER, R. A. y SHREWSBURY, M. A. 1976. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver: its purification, properties, and immunochemical studies. *J. Biol. Chem.* 251: 3815.
- 117.- KANDUTSCH, A. A. y SAUCIER, S. E. 1969. Prevention of cyclic and triton-induced increases in hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by Puromycin, *J. Biol. Chem.* 244: 2299
- 118.- RODWELL, V. W., NORDSTRON, J. L. y MITSCHELEN, J. J. 1976. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid. Res.* 14:1.
- 119.- SHAPIRO, D. J. y RODWELL, V. E. 1971. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 246: 3210
- 120.- DIETSCHY, J. M., y BROWN, M. S. 1974. Effect of alterations of the specific activity of intracellular acetyl CoA pool on apparent rates of hepatic cholesterologenesis. *J. Lipid. Res.* 15: 508
- 121.- RODWELL, V. W. 1973. En "Current trends in the Biochemistry of Lipids" (Ed: R. M. S. Somellic), p. 295



122. - WHITE, L. W. y RVONEY, H. 1970. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl and mevalonate biosynthesis by rat liver homogenates. Effects of fasting, cholesterol feeding, and triton administration. *Biochemistry* 9:2725
123. - SUGIYAMA, T., CLINKEMBEARD, K., MOSS, S. y LANE, M. D. 1972. Multiple Cytosolic forms of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl CoA synthase: possible regulatory role in cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 255.
124. - GOULD, G. y SWYRYO, E. A. 1966. Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis, *J. Lipid. Res.* 7:698.
125. - SLAKEY, L. K., CRAIG, M. C. BEYTIA; E. y BRIEDIS, A. 1972. The effects of fasting, refeeding and time of day on the levels of enzymes effecting the conversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A to squalene. *J. Biol. Chem.* 247:3014.
126. - BROWN, M. S., DANA, S. E. y GOLDSTEIN, J. L. 1973. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 70: 21662
127. - FOGELMAN, A. M., EDMOND, J., SEAGER, J. y POPJAK, G. 1975. Abnormal induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in leukocytes from subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia *J. Biol. Chem.* 250: 2045.
128. - GOLFARB, S. 1972. Submicrosomal localization of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductasa. *FEBS Lett.* 24: 153
129. - MITROPOULOS, A., VENKATESAN, S., BALASUBBRANANIAM, S. y PETERS, T.J., 1978. The submicrosomal localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme - A reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase and cholesterol in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 82: 419.
130. - HULCHER, F. H., y OLESON, W. H. 1973. Simplifred Spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J. Lipid. Res.* 14: 625.
131. - HELLER, R. A. y GOULD, R. G. 1974. Reversible cold inactivation of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 249: 5254.

- 132.- HUBER, J., LATZIN, S. y HAMPRECHT, B. 1973. A simple and rapid radiochemical assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Hopper-Seyler, Z. Physiol. Chem.* 354: 1645.
- 133.- SHAPIRO, D. J., IMBLUM, R. L. y RODWELL, V. W. 1969. Thin-layer chromatographic assay for HMG-CoA reductase and mevalonic acid. *Anal. Biochem.* 31: 383.
- 134.- KANDUTSCH, A. A. y CHEN. H. W. 1973. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 α -hydroxycholesterol 7 β -hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 248: 8408
- 135.- SHAPIRO, D. J., NORDSTROM, J. L., MITSCHELEN, J. J., RODWELL. V. W. y SCHINKE, R. J. 1974. Microassay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 370: 369
- 136.- PHILIPP, B. W., y SHAPIRO; D. J. 1979. Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid Res.* 20: 588
- 137.- BACK, P., HAMPRECHT, B., LYNEN, F. 1969. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133: 11
- 138.- GOLDFARB, S., y PITOT, H. C. 1971. Improved assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid. Res.* 12: 512.
- 139.- HIGGINS, M., KAWACHI, T. y RUDNEY, H. 1971, The mechanism of the diurnal variation of hepatic HMG-CoA reductase activity in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 138.
- 140.- EDWARDS, P. A. y GOULD, R. G. 1974. Dependence of the circadian rhythm of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on ribonucleic acid and synthesis. *J. Biol. Chem.* 249: 2891
- 141.- DUGAN, R. E., SLAKEY, L. L., BRIEDIS, A. V., PORTER, J. W. 1972. Factors affecting the diurnal variation in the level of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol-synthesizing activity in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 21.
- 142.- MCNAMARA, D. J., FORREST, W. Q. y RODWELL, V. W. 1972. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Developmental pattern. *J. Biol. Chem.* 247: 5805.

143. - TAKEUCHI, N., KOGA, M. KUKI TA, H., UCHIDA, K. y YAMAMURA, Y. 1978. Aging and hepatic cholesterol metabolism: initial changes of cellular components concerning cholesterol-metabolism in rat livers by aging: En "liver and Aging (Ed.: K. Kitani), p. 177, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
144. - KANDUTSCH, A. A. y SAUCIER, S. E. 1969. Regulation of sterol synthesis in developing brains of normal and Jimpy mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 135: 201.
145. - ARAGON, M. C, GIMENEZ C. VALDIVIESO, F., MAYOR, F. 1978. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NASPH) activity in rat brain during development. *J. Neurochem.* 30: 649.
146. - NESS, G. C., MILLER, J. P., MOFFLER, M. H. WOODS, L. S. HARRIS, H. B. 1979. Perinatal development of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver and brain. *Lipids.* 14: 447
147. - BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., DIETSCHY, J. M. 1979. Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states. *J. Biol. Chem.* 254:5144.
148. - BEG; Z. H., ALLMANN, D. W. y GIBSON, D. M. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with AMPc and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 1362.
149. - BROWN, M. S., BRUNSCHEDI, G. Y. y GOLDSTEIN j. 1975. Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. *J. Biol. Chem.* 250:2502
150. - NORDSTROM, J. L., RODWELL, V. W. y MITSCHHELEN, J. J. 1977. Interconversion of active and inactive forms of rat liver hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 252: 8924.
151. - INGEBRITSEN. T. S., LEE, H., PARKER, R. A. y GIBSON, D. M. 1978. Reversible modulation of the activities of both liver microsomal hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and its inactivating enzyme. Evidence for the regulation by phosphorylation-dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 1258

- 152.- BEG, Z. H., STONIK, J. A. y BREWER, H. B. 1978. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. - Regulation of enzymatic activity by phosphorylation and desphosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 76: 3678
- 153.- BOVE, J., y HEGARDT, F. G. 1978. Reversible modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductasa. Evidence for an enzyme-catalyzed phosphorylation-dephosphorylation system. FEBS Lett. 90: 198.
- 154.- KEITH, L. M., RODWELL, V. W., ROGERS, D. H. y RUDNEY, H. 1979. In vitro phosphorylation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: Analysis of ³²P-labeled, inactivated enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 3969.
- 155.- LIN, R. C. y SNODGRASS, P. J. 1980. Conversion of inactive 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase to its active enzyme culture of rat hepatocytes. FEBS Lett. 109: 171.
- 156.- GIL, G., SITGES, M., BOVE, J. y HEGARDT, F. G. 1980. Phosphorylation-dephosphorylation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase associated with changes in activity FEBS Lett. 110: 195.
- 157.- BEG, Z. H., STONIK, J. A. y BREWER, H. B. 1979. Characterization and regulation of reductase kinase, a protein kinase that modulates the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 76: 4375.
- 158.- KANDUTSCH, A. A. y CHEN, H. W. 1974. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. J. Biol. Chem. 249: 6067
- 159.- BROWN, M. S., DANA, S. E. y GOLDSTEIN, J. L. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultered human fibroblast. J. Biol. Chem. 249: 789
- 160.- HIGGINS, M. J. P., BRADY, D., y RUDNEY, H. 1974. Rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: A comparison and immunological study of purified solublized preparations, and alteration of enzyme levels by cholestyramine feeding. Arch. Biochem. Biophys. 163: 271

- 161.- ERICKSON, S. K., DAVISON, A. M. y GOULD, R. G. 1975. Correlation of rat liver chromatin-bound free and esterified cholesterol with the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the rat. *Biochem. Biophys. Acta* 409:59
- 162.- HARRY, D. S., DINI, M. y MCINTYRE, N. 1973. Effect of cholesterol feeding and biliary obstruction on hepatic cholesterol biosynthesis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 296: 209
- 163.- HORTON, D. J. y SABINE, J. R. 1973. Metabolic controls in precancerous liver - IV. Loss of feedback control of cholesterol synthesis and impaired cholesterol uptake in ethionine-fed rats. *Europ. J. Cancer.* 9: 11
- 164.- SABINE, J. R. 1976. Metabolic controls in precancerous liver-VII. Time course of loss of dietary feedback control of cholesterol synthesis during carcinogen treatment. *Europ. J. Cancer* 12:299
- 165.- GEBHARD, R. L., y COOPER, A. D. 1978. Regulation of cholesterol synthesis in cultured canine intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* 253:2790
- 166.- SAKAKIDA, H., SHEDIAC, C. y SIPERSTEIN, D. M. 1963. Effect of endogenous and exogenous cholesterol on the feedback control of cholesterol synthesis. *J. Clin. Invest.* 42: 9
- 167.- SMITH, I. M. y GREEN, C. 1974. The rate of cholesterol "Flip -Flop" in lipid bilayers and its relation of membran sterol pools. *FEBS Lett* 42:108
- 168.- VANDERSKOOI, J., FISCHKOFF, S., CHANCE, B. y COOPER, A. 1974. Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol rich membranes. *Biochemistry* 13: 15899.
- 169.- NAITO, M. 1978. Effects of cholesterol and cholesterol esters on cell function I. Incorporation of free cholesterol and cholesterol oleate into the cell membrane and its effect on membrane fluidity, membrane fragility and DNA synthesis. *Cell Structure and Function.* 3:219
- 170.- KUTCHAI, H., ROSS, T. F., DUNNING, D. M., MARTIN, M. y KING, S. L. 1978. Developmental changes in the fatty acid composition and cholesterol content of chicken heart plasma membrane. *J. Comp. Physiol.* 125: 151

- 171.- BOLAND, R. A., MARTONOSI, A., TILLACK, T. W. 1974. Developmental changes in the composition and function of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249:612.
- 172.- VICKERS, J. D., y RATHBONE, M. P. 1979. The effect of membrane cholesterol depletion upon erythrocyte membrane-bound enzymes. 57:1144
- 173.- ALDERSON, J. C. E. y GREEN, C. 1975. Enrichment of lymphocytes with cholesterol and its effect on lymphocyte activation. *FEBS Lett.* 52: 208.
- 174.- BELL, F. P. y SCHWARTZ, C. J. 1971. Exchangeability of cholesterol between swine serum lipoproteins and erythrocytes "in vivo". *Biochim. Biophys. Acta* 231: 553.
- 175.- COOPER, R. A. y JANDL, J. H. 1969. The selective and conjoint loss of red cell lipids. *J. Clin. Inv.* 48: 906
- 176.- GRAHAM, J. M. y GREEN, C. 1970. The properties of mitochondria enriched "in vivo" with cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 12: 58
- 177.- KROES, J. y OSTWARD, R. 1971. Erythrocyte membrane-effect of increased cholesterol content on permeability . *Biochim. Biophys. Acta* 249: 647
- 178.- MURPHY, J. R. 1962. Erythrocyte metabolism. III. Relationship of energy metabolism and serum factors to the osmotic fragility following incubation, *J. Lab. & Clin. Med.* 60: 86.
- 179.- NAITO, M. 1978. Effects of cholesterol and cholesterol esters on cell function II. The effects of various cholesterol esters on the cell membrane and related functions. *Cell Structure and Function.* 3: 227.
- 180.- LANG, M. 1976. Dietary cholesterol caused modification in the eststructure and function of rat hepatic microsomes, studied by fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 947
- 181.- SIPAT, A. B., JAMES, M. J. y SABINE, J. R. 1977. Effect of cholesterol feeding on β -Hydroxy- β -methylglutaryl (HMG) CoA reductase and other microsomal enzymes in the rat liver. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* 10:53

- 182.- HELLER, R. A., KLOTZBUCHER, R., y STOFFEL, W. 1979. Interactions of a photosensitive analog of cholesterol with hydroxymethylglutaryl CoA reductase (NADPH) and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1721
- 183.- FINKEL, R. S. y VOLPE, J. 1979. A potential role for phospholipids in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in cultured C-6 glial cells. Biochim. Biophys. Acta 572: 461
- 184.- KANDUTSCH, A. A. y CHEN., H. W. 1978. Inhibition of cholesterol synthesis by oxigenated sterols. Lipids 13: 704
- 185.- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. 1974. Familial hypercholesterolemia defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 788
- 186.- KIRSTEN, E. S. y WATSON, J. A. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in hepatoma tissue culture cells by serum lipoproteins. J. Biol. Chem. 249: 6104.
- 187.- GOLDSTEIN, J. L. y BROWN, M. S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 249:5153
- 188.- WESTERGAARO, H. y DIETSCHY, J. M. 1976. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal Cell. J. Clin. Invest. 58: 97.
- 189.- MERCHANT, J. L., y HELLER, R. A. 1977. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase in isolated villous and crypt cells of rat ileum. J. Lipid Research 18:722
- 190.- LAKSHMANAN, M. R., NEPOKROEFF, C. M. NESS, G. C. DUGAN, R. E. y PORTER, J. W. 1973. Stimulation by insulin of rat liver β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol-synthesising activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50: 704.
- 191.- DUGAN, R. E., NESS, G. C., LAKSHMANAN, M. R., NEPOKROEFF, C. M., PORTER, J. W. 1974. Regulation of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase by the interplay of hormones. Arch. Biochem. Biophys. 161: 499.

- 192.- NEPOKROEFF, C. M., LAKSHAMANAN, M. R. NESS, G. C., DUGAN, R. E. 1974. Regulation of the diurnal rhythm of rat liver β -hydroxy- β methylglutaryl coenzyme A reductase activity by insulin, glucagon, cyclic AMP and hidro cortisone. Arch. Biochem. Biophys. 160:387
- 193.- LAKSHAMANAN, M. R., DUGAN, R. E., NEPOKROEFF, C. M. NESS, G. C., y PORTER; J. W. 1975. Regulation of rat liver β -hydroxy- β methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol levels of serum and liver in various dietary and hormonal states. Arch. Biochem. Biophys. 168:89.
- 194.- HUBER, J., GUDER, W., LATZIN, S., y HAMPRECHT, B. 1973. The influence of insulin and glucagon on hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver. Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem. 354: 795.
- 195.- GUDER, W., NOLTE, I., EIELAND, O. 1968, The influence of thyroid homones on β -hydroxy- β methylglutaryl-CoA reductasa of rat liver. Eur. J. Biochem. 4: 273.
- 196.- NESS, G. C. DUGAN, R. E. LAKSHMANAN, M. F., NEPOKROEFF, C. M. y PORTER, J. W. 1973. Stimulation of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase activity in hypophysectomized rats by L-Tryodothyronine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70:3839.
- 197.- HICKMAN, D. E., HORTON, B. J. y SABINE; J. R. 1972. Effect of adrenalectomy on the diurnal variation of hepatic cholesterologenesis in the rat. J. Lipid. Res. 13:17
- 198.- EDWARDS, P. A. 1973. Effect of adrenalectomy and hypophysectomy on the circadian rhythm of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. J. Biol. Chem. 248: 2912.
- 199.- BORTZ, W. M. 1968. Noradrenalin-induced increase in hepatic cholesterol synthesis and its blockade by puromycin. Biochim. Biophys. Acta. 152: 619.
- 200.- EDWARDS, A. P., LEMONGELLO, D., FOGELMAN, A. M. 1979. Effect of glucagon, norepinephrine, and dibutyryl cyclic AMP on cholesterol efflux and on the activity of β -3-hydroxy- β -methylglutaryl CoA reductasa in rat hepatocytes. J. Lipid. Res. 20:1

- 201.- BROW, M. S., y GOLDSTEIN, J. L. 1974. Suppression of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblast by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 249: 7306
- 202.- MUKHERJEE, S., y BHOSE, A. 1968. Studies on estrogen regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Acta* 164:357.
- 203.- KANDUTSCH, A. A. y PACKE, R. M. 1970. Comparison of the effects fo some C₂₇-, C₂₁-, steroids upon hepatic sterol synthesis and hydroxymethylglutaryl-CoA reductasa activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:122
- 204.- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L. y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- 205.- SANTIAGO; E., GANSER, A. MACARULLA, J. M. y GUERRA, F. 1968. "in vivo" effect of ascorbate on the phospholipid composition of various sub-cellular fractions. *Rev. Esp. Fisiol.* 24: 37
- 206.- CARR, J. J., y DREKKER, I. J. 1962. Laboratory manual of pediatric micro and ultramicro biochemical techiques. O'Brien and Ibloft F. A. Harper Row. Publishers, New Yorl.
- 207.- MARTENSSON, E. H. 1963. Investigation of factors affecting the Liebermann-Burchard cholesterol reaction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15: 164.
- 208.- COROMINAS, A., y PERMANYER, J. J. 1972. Lípidos y Lipoproteínas. Vol. 1 (Edit. Científico Medica. Barcelona)
- 209.- FISKE, G. H., y SUBBAROW, Y. L. 1925. *J. Biol. Chem.* 65: 375.
- 210.- BARTEET T G. R. (1959). Phosphorus essay in Column Chromatography *Biol. Chem.* 234: 466.
- 211.- VITIELLO, F. y ZANETTA, J. P. 1978. Thin-layer chromatography of phospholipids. *J. Chromatogr.* 166: 637
- 212.- SABINE, J. R. y JAMES, M. J. 1976. The intracellular Mechanism Responsible for dietary Feedback control of cholesterol synthesis. *Life. Sci.* 18 / 11: 1185.

- 213.- AGUILERA, J. A. 1979. Evolución del contenido en colesterol y de la incorporación de ácido mevalónico en hígado, cerebro y riñón de pollo a lo largo del desarrollo postnatal. Tesina de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Granada.
- 214.- GARCIA-MARTINEZ; J. 1978. Caracterización de las enzimas fosforilantes del ácido mevalónico en hígado de pollo recién nacido. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias. Granada.
- 215.- LINARES, A. 1978. Contribución del cerebro y de riñón al metabolismo del ácido mevalónico durante el desarrollo postnatal de pollo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Granada
- 216.- SHAMA BHAT, C. y RAMASARMA, T. 1979. Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase and mevalonate phosphate kinase by phenyl and phenolic compounds. *Biochem. J.* 181: 275.
- 217.- BERNDT J. y GAUMERT, R. 1974. Evidence for an activating-inactivating system of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in mouse liver. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355: 905.
- 218.- BEG, Z. H. , STONIK J. A. y BREWER, Jr. H. B. 1977. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from chicken liver *FEBS Lett.* 80: 123.
- 219.- BEG, Z. H., STONIK, J. A. y BREWER, J. H. B. 1978. Solubilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase from rat and chicken liver microsomas. *Anal. Biochem.* 86: 531
- 220.- BEG, Z. H., STONIK, J. A. y BREWER, Jr., H. B. 1979. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from avian liver . Catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 572: 83.
- 221.- RAMIREZ, H. 1980. Influencia de la alimentación sobre la evolución diurna de la biosíntesis del colesterol en pollo; Efecto sobre la HMG-CoA reductasa y la composición lipídica microsomal. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Granada.
- 222.- GREENGARD, O. 1971. Enzymic differentiation in mammalian tissue. *Essays Biochem.* 7: 159

- 223.- GARICA MARTINEZ, J., SEGOVIA, J. L., SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN, E. 1976. Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 202
- 224.- MARCO, C. Comunicación personal.
- 225.- LINARES, A., GARCIA-MARTINEZ, J., SUAREZ, M. D. y GARCIA PEREGRIN E. 1980. Postnatal development of mevalonate a phosphorylation in the chick brain and kidney. *Biol. Neonate.* 38: 25
- 226.- SUDJIC, M. M. y BOOTH, R. 1976. Activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase in brains of adult and 7 day-old rats. *Biochem. J.* 154: 559
- 227.- GRANDGEORGE, M., DUPERRAY, B. y PACHECO H. 1977. Etude de la biosynthese des acides biliars par des coupes de foie de rat á l'aide de ¹⁴C-acetate. *J. Pharmacol.* 8:297.
- 228.- SWANN; A., EILLEY, M. H. y SIPERSTEIN, M. D. 1975. Tissue distribution of cholesterol feedback control in the ginea pig. *J. Lipid. Res.* 16: 360.
- 229.- EDWARDS, P. A., POPJAK, A. M. y EDMOND, J. 1977. Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase by endogenously synthesized in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 252: 1057.
- 230.- GOULD, R. G. 1977 En "Cholesterol metabolism and lipolytic enzymes" (Ed: Polonovski, J.), p. 13, Masson, New York.

