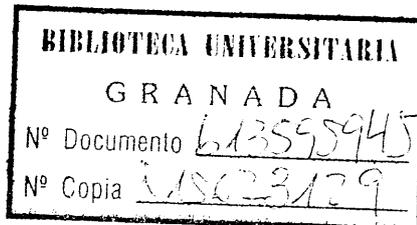


R-49-249

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

INFLUENCIA DE LA ALIMENTACION SOBRE LA EVOLUCION DIURNA DE
LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN POLLO: EFECTO SOBRE LA HMG-CoA
REDUCTASA Y LA COMPOSICION LIPIDICA MICROSOMAL

HILARIO RAMIREZ RODRIGO
Tesis doctoral



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980

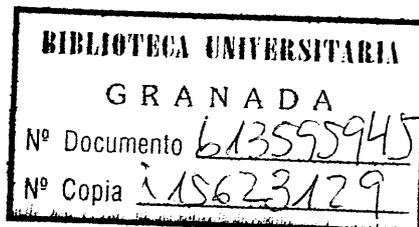
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
— CHIAZIATA —
Sala B
Prest. 137
C. 167

R-49-249

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

INFLUENCIA DE LA ALIMENTACION SOBRE LA EVOLUCION DIURNA DE
LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN POLLO: EFECTO SOBRE LA HMG-CoA
REDUCTASA Y LA COMPOSICION LIPIDICA MICROSOMAL

HILARIO RAMIREZ RODRIGO
Tesis doctoral

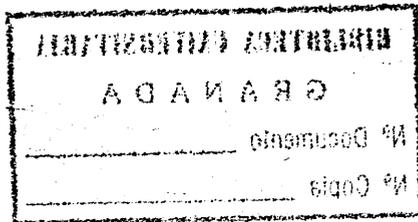


UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980

DEPARTAMENTO DE ECONOMÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES ECONÓMICAS
LA ECONOMÍA DE LA TRANSICIÓN EN ESPAÑA
INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN



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. M^a Dolores Suárez Ortega. Fue leída el día 11 de julio de 1980, ante el tribunal formado por los Profesores: Lozano Teruel, Córdoba; Esteller Pérez, Granada; Macarulla Greoles, Bilbao; Sánchez de Medina, Granada; García Peregrín, Granada. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

Al concluir la presente memoria, es alentador comprobar el gran número de personas que han contribuido a su realización. Quiero expresar en primer lugar mi reconocimiento al profesor Dr. D. Fermín Sanchez de Medina, director del Departamento de Bioquímica, en que se ha llevado a cabo.

Deseo también expresar mi profunda gratitud al profesor Dr. D. Eduardo García-Peregrín, director de este trabajo, quién guió acertadamente esta primera etapa de mi formación científica; con su gran preparación, dimensión humana y entusiasmo, supo crear el entrañable equipo del que un día me permitió formar parte. A la profesora Dra. D^a M^a Dolores Suárez, Codirectora de este trabajo, quién aparte de un valioso asesoramiento científico supo brindarme en todo momento la confianza, ilusión y optimismo imprescindibles para llevarlo a cabo. A la profesora Dra. D^a M^a Josefa L. Segovia, con quién sostuve frecuentes e interesantes discusiones de las que surgió el planteamiento e interpretación de una parte importante de los resultados.

El presente estudio forma parte de un proyecto más amplio en el que trabajé junto a M^a José Alexandre. Si hubo fruto, fué sin duda gracias a su tenacidad, su gran capacidad de trabajo y su infinita paciencia. Vaya pues, a ella, mi más grato recuerdo. Quiero también agradecer a M^a Flor Zafra, Ana Linares, J. Antonio Aguilera, M^a Dolores Franco, M^a Romero, y demás compañeros de Departamen-

to su inestimable ayuda en el laboratorio y en la preparación final de la Memoria. Ha sido para mi de gran valor el asesoramiento prestado por el profesor Dr. D. Cecilio Gonzalez y la Dra. M^a Angeles Ferro del Departamento de Química Inorgánica. Finalmente quiero extender mi agradecimiento a todos los compañeros y amigos, demasiado numerosos para poder mencionarlos individualmente, que me proporcionaron información y me aconsejaron y ayudaron en la preparación de muchas secciones de esta Memoria.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This includes both incoming and outgoing payments, as well as any interest or fees associated with the account. Proper record-keeping is essential for ensuring the integrity of the financial data and for facilitating any future audits or reconciliations.

2. The second part of the document outlines the procedures for reconciling the account statements with the internal records. This process involves comparing the bank's records with the company's own records to identify any discrepancies. Any differences should be investigated and resolved promptly to ensure that the financial statements are accurate and reliable.

3. The third part of the document provides a detailed breakdown of the account activity for the reporting period. This includes a summary of the opening and closing balances, as well as a list of all transactions that occurred during the period. Each transaction is recorded with the date, amount, and a brief description of the nature of the transaction.

4. The fourth part of the document discusses the overall financial performance of the account during the reporting period. This includes an analysis of the revenue generated, the expenses incurred, and the resulting net income or loss. This information is used to evaluate the account's contribution to the overall financial health of the organization and to identify areas for improvement.

5. The fifth part of the document provides a summary of the key findings and conclusions from the reconciliation process. This includes a statement of the accuracy of the records, a list of any discrepancies that were identified, and a description of the steps taken to resolve these discrepancies. This summary is used to provide a clear and concise overview of the account's performance and to ensure that all relevant parties are kept informed of the results.

a Ana Maria

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	Lipoproteinas de alta densidad
HMG	Acido 3-hidroxi-3-metil-glutarico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
LDL	Lipoproteinas de baja densidad
MVA	Acido mevalonico
NADP	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleotido oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleotido reducido
POPOP	2, 2'-p-fenilen bis-(5-feniloxazol)
PPO	2-5-difeniloxazol
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
P-MVA	Acido fosfomevalonico
PP-MVA	Acido pirofosfomevalonico
-SH	Radical sulfhidrilo
SM	Esfingomielina

1.1.1. Planteamiento del modelo: el espacio de transferencia.
1.1.2. Entradas al espacio de transferencia.
1.1.2.1. Síntesis endógena.
1.1.2.2. Absorción.
1.1.3. Salidas del espacio de transferencia.
1.1.3.1. Excreción y secreción externa.
1.1.3.2. Transformación a ácidos biliares.
1.1.4. Efecto de la alimentación sobre el "turn-over" del colesterol.
1.2. Regulación de la Biosíntesis del colesterol: Papel central de la HMG-CoA reductasa.



INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	23
I.- PARTE TEORICA.....	31
1.1.- Dinámica del colesterol en el organismo.....	33
1.1.1.- Planteamiento del modelo: el espacio de transferencia.....	33
1.1.2.- Entradas al espacio de transferencia.....	35
1.1.2.1.- Síntesis endógena.....	35
1.1.2.2.- Absorción.....	38
1.1.3.- Salidas del espacio de transferencia.....	42
1.1.3.1.- Excreción y secreción externa... ..	42
1.1.3.2.- Transformación a ácidos biliares.	45
1.1.4.- Efecto de la alimentación sobre el "turn- over" del colesterol.....	49
1.2.- Regulación de la Biosíntesis del colesterol: Papel central de la HMG-CoA reductasa.....	58

1. 3. - Estudio de la HMG-CoA reductasa.....	65
1. 3. 1. - Distribución y localización de la enzima....	65
1. 3. 2. - Solubilización de la HMG-CoA reductasa microsomal.....	66
1. 3. 3. - Ritmo diurno de actividad.....	71
1. 3. 3. 1. - Efectos de la luz y la dieta.....	73
1. 3. 3. 2. - Causas del ritmo.....	74
1. 3. 3. 3. - Desarrollo del ritmo diurno.....	81
1. 3. 4. - Modulación de la HMG-CoA reductasa.....	84
1. 3. 4. 1. - Regulación de la actividad y de la cantidad de enzima.....	84
1. 3. 4. 1. 1. - Hormonas.....	84
1. 3. 4. 1. 2. - Esteroides.....	86
1. 3. 4. 1. 3. - Otros factores.....	89
1. 3. 4. 1. 4. - Estado actual del pro blema.....	92
1. 3. 4. 2. - Regulacion por modificación co- valente.....	93
1. 3. 4. 3. - Regulación a nivel de membrana..	95
II. - PLAN DE TRABAJO.....	101
III. - MATERIAL Y METODOS.....	105
3. 1. - MATERIAL.....	107
3. 1. 1. - Material biológico.....	107
3. 1. 2. - Acondicionamiento de los animales.....	107
3. 1. 3. - Instrumentación.....	108
3. 1. 4. - Reactivos.....	110
3. 2. - METODOS.....	112
3. 2. 1. - Determinación de la actividad HMG-CoA reduc- tasa.....	112
3. 2. 1. 1. - Fundamento del método radiactivo..	113

	<u>Páginas</u>
3.2.4.2.1.- Determinación de fosfolí- pidos totales.....	135
3.2.4.2.2.- Determinación cuantitati- va de fosfolípidos mayo- ritarios.....	136
3.2.5.- Medida simultánea de radiactividad debida a ^3H y ^{14}C , presentes en la misma muestra, mediante es- pectrometría de centelleo líquido.....	139
IV.- RESULTADOS.....	147
4.1.- Caracterización de la HMG-CoA-reductasa como enzima ligada a membranas microsomales.....	149
4.1.1.- Cambios en la actividad enzimática dependientes de la temperatura.....	149
4.1.1.1.- Representación de Arrhenius: Cálcu- lo de las energías de activación ...	149
4.1.1.2.- Efecto de la suplementación de coles- terol en la dieta sobre la temperatu- ra de transición.....	153
4.1.1.3.- Inactivación térmica de la enzima...	156
4.1.2.- Efecto de los sobrenadantes de 105.000 x g so- bre la actividad microsomal.....	160
4.1.3.- Solubilización parcial de la enzima. Técnica del "freezing - thawing".....	161
4.2.- Variaciones de la actividad HMG-CoA reductasa a lo lar- go del día. Influencia de la alimentación.....	166
4.2.1.- Evolución diurna de la actividad en animales ali- mentados con dieta estandar.....	166

	<u>Páginas</u>
4. 2. 1. 1.- Evolución en hígado.....	167
4. 2. 1. 2.- Evolución en duodeno.....	172
4. 2. 1. 3.- Evolución en cerebro.....	172
4. 2. 1. 4.- Variaciones diurnas a lo largo del desarrollo postnatal.....	172
4. 2. 2.- Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta sobre los cambios de actividad diurna....	185
4. 2. 2. 1.- Influencia en hígado.....	185
4. 2. 2. 2.- Influencia en duodeno.....	187
4. 2. 2. 3.- Influencia en cerebro.....	187
4. 2. 2. 4.- Influencia sobre las variaciones diurnas a lo largo del desarrollo postnatal	194
4. 2. 3.- Influencia del ayuno sobre los cambios de actividad diurna.....	194
4. 2. 3. 1.- Influencia en hígado.....	197
4. 2. 3. 2.- Influencia en duodeno.....	197
4. 2. 3. 3.- Influencia en cerebro.....	200
4. 3.- Variaciones diurnas de la incorporación de ¹⁴ C-acetato a lípidos insaponificables. Influencia de la alimentación..	202
4. 3. 1.- Cambios de la radiactividad incorporada en animales con dieta estandar	202
4. 3. 1. 1.- Cambios en hígado.....	203
4. 3. 1. 2.- Cambios en duodeno.....	203
4. 3. 2.- Efecto del colesterol suplementado a la dieta...	203
4. 3. 2. 1.- Efecto en hígado.....	206
4. 3. 2. 2.- Efecto en duodeno.....	206
4. 3. 3.- Efecto del ayuno.....	206

	<u>Páginas</u>
4.3.3.1.- Efecto en hígado.....	211
4.3.3.2.- Efecto en duodeno.....	211
4.4.- Influencia del ayuno y de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la composición de las membranas microsomas. Evolución a lo largo del día.....	216
4.4.1.- Microsomas de hígado.....	216
4.4.1.1.- Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado.....	216
4.4.1.2.- Variaciones del contenido en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y fosfatidilinositol.....	218
4.4.1.3.- Variaciones en la relación molar colesterol/ fósforo lipídico.....	228
4.4.2.- Microsomas de duodeno.....	228
4.4.2.1.- Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado.....	228
4.4.2.2.- Variaciones del contenido en fosfolípidos totales y en esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol	233
4.4.2.3.- Variaciones en la relación molar colesterol/ fósforo lipídico.....	139
4.4.3.- Microsomas de cerebro.....	239
4.4.3.1.- Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado.....	239

	<u>Páginas</u>
4.4.3.2.- Variaciones del contenido en fosfolípi- dos totales y en esfingomielina , fos- fatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol.....	244
4.4.3.3.- Variaciones en la relación molar co- lesterol / fósforo lipídico.....	250
V.- DISCUSION.....	257
VI.- CONCLUSIONES	287
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	295

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

INTRODUCCION

11/11/2023

INTRODUCCION

El metabolismo del colesterol, en sus diversos aspectos, ha sido objeto de intensos estudios durante las últimas décadas como lo evidencia la abundante bibliografía de que se dispone sobre el tema. Existen sólidos argumentos que justifican este hecho. Por una parte el colesterol posee un papel estructural importante, como constituyente de la mayor parte de las membranas celulares, por otra, es el punto de partida para la biosíntesis de sustancias que, como las hormonas sexuales y corticosteroides y las vitaminas D, son esenciales para el correcto funcionamiento del organismo.

El colesterol, además, es uno de los factores directamente implicados en la aparición y desarrollo de la aterosclerosis. Por otra parte su biosíntesis sufre modificaciones detectables durante determinados procesos de carcinogénesis hepática que pueden ser de gran interés en el diagnóstico precoz de esta enfermedad. Si se tiene presente que el 95 % de las trombosis coronarias y el 75 % de las apoplejías cerebrales se deben a la arteriosclerosis y que ambas situaciones determinan en las sociedades occidentales la muerte de casi el 50 % de los seres humanos, resulta obvio el especial interés que la comprensión de este campo del metabolismo ha despertado en los últimos años.

Las dos únicas fuentes de colesterol que posee un organismo son la dieta y la biosíntesis endógena, a cargo, fundamentalmente, del hígado y del tracto gastrointestinal. Las aportaciones de cada una de estas fuentes varía ampliamente según la especie de que se trate. En el hombre, la más importante corresponde a la sintetizada por él mismo (70 %), situándose tan



sólo en un 30 % la contribución del colesterol presente en la dieta. En la rata, el animal mejor estudiado, la situación se invierte.

Ambos mecanismos de obtención de colesterol están estrechamente relacionados entre sí, de tal modo que un incremento del contenido de colesterol presente en la dieta, provoca una drástica disminución en la velocidad de biosíntesis hepática en la rata. En estas condiciones así como en otras muchas, la enzima más rápida y fuertemente afectada es la HMG-CoA reductasa, que cataliza la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A a ácido mevalónico.

Una amplia evidencia experimental sugiere que esta etapa constituye, en realidad, el paso limitante de la biosíntesis del colesterol bajo la mayor parte de las condiciones fisiológicas, razón por la cual ha canalizado la atención de numerosos investigadores. En efecto, se ha encontrado que la regulación de esta enzima es defectuosa en la hipercolesterolemia familiar y en tumores hepáticos, lo que hace pensar que el entendimiento de su regulación puede ser importante para la bioquímica, diagnosis y eventual terapia de las enfermedades cardíacas y el cáncer.

Por otra parte, como enzima biosintética que en mamíferos es susceptible a los cambios de la dieta, del estado hormonal, y de otros factores; que además presenta un ritmo diurno de actividad y un comportamiento complejo durante el desarrollo, es de interés para el bioquímico por propio derecho.

Cronológicamente, el conocimiento del papel central de esta enzima en la ruta biosintética del colesterol coincidió con el apogeo de los

estudios de regulación por productos finales que culminaran con la brillante resolución del control de numerosas rutas, fundamentalmente en microorganismos, y con la generalización del concepto de retroalimentación. El desarrollo de las investigaciones sobre la HMG-CoA reductasa habría que insertarlo, pues, en el contexto de un paradigma especialmente arraigado en los años cincuenta, según el cual, los productos finales de una secuencia metabólica podrían ejercer una acción directa sobre su propia síntesis a nivel de la etapa limitante de la ruta.

Habida cuenta del drástico efecto del colesterol de la dieta sobre la HMG-CoA reductasa hepática en algunos mamíferos cabía pensar que las cosas sucedían de este modo. Los planteamientos experimentales realizados, no obstante, no han dado los resultados apetecidos: El colesterol no posee ningún efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa "in vitro". Ni siquiera: las nociones, acuñadas posteriormente, de regulación a nivel de síntesis proteica, mediada o no por hormonas, son suficientes para explicar ciertos efectos que por su rapidez son incompatibles con dichos mecanismos nucleares de control.

Actualmente dos nuevas directrices intentan llenar este vacío. Una de ellas arranca del hallazgo de dos formas interconvertibles de la enzima, una de ellas fosforilada e inactiva y la otra defosforilada y activa. El equilibrio entre ambas podría estar regulado por un sistema de protein-cinasas y fosfatasas similar al implicado en el metabolismo del glucógeno. La segunda de estas directrices surge de la naturaleza de la reductasa como enzima ligada a membrana. Hoy no es sostenible el concepto de membrana biológica, como mera unidad estructural, sino que debe entenderse como un elemento singular activamente implicado en el conjunto de

interrelaciones metabólicas y especialmente capaz de influir sobre las actividades de las enzimas localizadas en su área de influencia. En algunos sectores de la enzimología, la incorporación de esta nueva herramienta conceptual ha dado ya su fruto. Los ahora clásicos trabajos de regulación de las enzimas respiratorias por interacción con las membranas que las sustentan son buen ejemplo de ello. En el caso de la HMG-CoA reductasa, las propiedades inherentes a su condición microsomal han sido profundamente ignoradas hasta hace tan solo unos pocos años. Sin embargo, los escasos trabajos dirigidos en este sentido evidencian ya claramente que los componentes del entorno lipídico que rodea a la enzima pueden tener un papel clave en su regulación.

En el momento actual son todavía muchos los puntos que quedan por resolver. En primer lugar, la importancia y significado fisiológico de cada uno de los mecanismos mencionados ha de establecerse aun. En segundo lugar está claro que la ingesta diaria de alimento es un factor decisivo en la regulación de la biosíntesis del colesterol y de su enzima clave, la HMG-CoA reductasa, como asimismo parece claro que el periodo postnatal reviste unas características peculiares que pueden ser decisivas para el correcto control de esta ruta metabólica durante las etapas posteriores de la vida del individuo. Sin embargo el conocimiento de su regulación, de su patrón diurno de comportamiento y del papel que en ella desempeña la dieta durante el mencionado periodo postnatal es prácticamente nulo. A nuestro juicio, además el papel que en todo ello pueden jugar los componentes lipídicos de las membranas microsomales ha sido escasamente considerado, cuando en realidad se trata de un proceso ligado en gran medida a esta fracción celular. Como circunstancia adicional la mayor parte de la información que se dispone procede de la rata, siendo escasos los estudios llevados

a cabo en otros mamíferos y prácticamente nulos en aves.

El pollo, como el conejo, posee una gran capacidad para asimilar y acumular colesterol exógeno, como lo evidencia la posibilidad de inducción de aterosclerosis experimental en estos animales, a diferencia de la rata o el perro, mediante tratamiento prolongado con dietas ricas en colesterol, por lo que pareció en este sentido, un sistema óptimo para abordar el estudio del efecto que la ingesta diaria posee sobre la síntesis endógena de esteroides y los cambios sufridos en la composición de sus membranas microsomas. Este animal constituye, además un modelo particularmente favorable de desarrollo, por su gran susceptibilidad de manipulación y por no presentar los problemas de interacción con el progenitor inherentes a tal tipo de estudios en mamíferos.

sobre estos supuestos, consideramos interesante iniciar el estudio sistemático del problema en pollos neonatos haciendo especial hincapié en los aspectos mencionados. Caracterización de la HMG-CoA reductasa como enzima ligada a membranas, establecimiento de su patrón diurno de actividad y de la velocidad total de la síntesis de esteroides, y finalmente influencia de la alimentación sobre ambos parámetros y sobre la composición de la membrana microsomal.

Dado que los órganos que contribuyen mayoritariamente son el hígado y el tracto gastrointestinal y que el proceso de mielinización en pollos, obviamente implicado en el metabolismo del colesterol, no acaba sino varios días después de la eclosión, se consideró conveniente emprender el estudio, paralelamente, en hígado, asa duodenal y cerebro.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha sido desarrollado en el marco de un convenio de colaboración entre el Departamento de Ingeniería de Materiales y el Departamento de Ingeniería de Organización de la Universidad de Sevilla, con el fin de investigar las posibilidades de aplicación de los métodos de optimización en el diseño de estructuras metálicas. El objetivo principal ha sido el de determinar el grado de influencia de los factores de diseño en el comportamiento estructural de una viga de acero, considerando tanto los aspectos de resistencia como de rigidez. Para ello se han realizado una serie de análisis de sensibilidad y de optimización, que han permitido identificar los factores más críticos y proponer soluciones de diseño más eficientes. Los resultados obtenidos demuestran que la optimización puede ser una herramienta muy útil para mejorar el rendimiento de las estructuras metálicas, reduciendo los costes y aumentando la seguridad y la durabilidad. Sin embargo, también se han detectado algunas limitaciones de los métodos de optimización, como la necesidad de un modelo matemático preciso y de un conocimiento detallado de las propiedades de los materiales y de las condiciones de carga. Por lo tanto, se recomienda utilizar estos métodos como una herramienta de apoyo a la decisión, en colaboración con la experiencia y el juicio del ingeniero responsable del diseño.

1. PARTE TEORICA

PLATE 11

1. 1. - DINAMICA DEL COLESTEROL EN EL ORGANISMO.

1. 1. 1. - Planteamiento del modelo: El espacio de transferencia.

Pese a que los aspectos generales de la absorción, síntesis y eliminación del colesterol son, en la actualidad, bien conocidos, los mecanismos reguladores implicados y sobre todo la forma en que tales mecanismos interaccionan entre sí en el animal intacto son, aún hoy, mal entendidos en gran parte. Este estado de cosas es el resultado, en primer lugar, de que la metodología adecuada no ha sido desarrollada sino muy recientemente y en segundo lugar, que la rápida miscibilidad de alguno de los "pools" de colesterol que existen en el organismo dificulta considerablemente la interpretación de los mecanismos locales de control (1, 2, 3). No obstante, en los últimos años se han desarrollado técnicas que, como la del equilibrio isotópico descrita en 1.963 (4) y ampliamente utilizada en la última década (5, 6, 7), la del análisis cinético isotópico (8) o combinaciones de ambas, han permitido avances considerables en este campo.

Sea cual sea el enfoque experimental empleado por los diversos autores, en todos los casos se parte de la concepción fundamental de que en un organismo en estado estacionario, cada componente está en equilibrio dinámico, de tal forma que la suma de las velocidades de entrada para dicho componente debe ser igual a la suma de las velocidades de salida. En el caso del colesterol hay dos procesos de entrada: la absorción intestinal del colesterol presente en la dieta y la propia biosíntesis endógena (9), y dos procesos mayoritarios de salida: la transformación a ácidos biliares (10) y la excreción (11). A partir de este equilibrio dinámico, puede

obtenerse gran información acerca del "turnover" del colesterol corporal. Para ello conviene definir, en términos de Chevallier (1, 12) un llamado "espacio de transferencia" que corresponde a la cantidad de colesterol en equilibrio con el plasma, determinado mediante el método del equilibrio isotópico (3).

Para un animal en estado estacionario, el equilibrio dinámico del colesterol en el espacio de transferencia se define por la siguiente expresión:

$$M_a + M_{is} = M_t + M_e (f+u) \quad (I)$$

en que es M_a la velocidad, en mg/día, de colesterol absorbido; M_{is} la de secreción interna; M_t la velocidad, igualmente en mg/día, de transformación a ácidos biliares y M_e la de excreción en heces (f) y orina (u). En la terminología introducida por Chevallier, la excreción se define como la transferencia de moléculas de colesterol desde el interior al exterior del espacio de transferencia, (por ejemplo, por pérdidas en el lumen intestinal o en túbulos renales, o por descamación de epitelios y secreciones sebáceas). Secreción es la síntesis de colesterol por los tejidos, y su transferencia al interior (secreción interna) o al exterior (secreción externa) del espacio de transferencia (3). Cuando un animal ingiere una dieta que contiene colesterol, la eliminación fecal M_f es la suma del colesterol no absorbido M_{ua} ; colesterol fecal excretado (M_{ef}) y colesterol fecal secretado externamente (M_{esf}) (13):

$$M_f = M_{ua} + M_{ef} + M_{esf} \quad (II)$$

En la literatura, el término "excreción endógena de colesterol" se corresponde generalmente con la suma de $M_{ef} + M_{esf}$. Es importante hacer esta distinción ya que la secreción fecal externa no forma parte de la salida del espacio de transferencia, como se desprende de la expresión 1.

1.1.2. - Entradas al espacio de transferencia

1.1.2.1. - Síntesis endógena. -

El colesterol sintetizado en los distintos tejidos del organismo constituye una de las fuentes de entrada al espacio de transferencia. Desde la óptica de su dinámica global surgen dos cuestiones fundamentales: de una parte, qué tejidos son capaces de sintetizar esteroides "de novo" y de otra, cuales son las velocidades relativas con que dichos tejidos llevan a cabo esta síntesis.

Los primeros estudios encaminados a responder estas cuestiones fueron abordados en 1946 por Bloch, Borek y Rittenberg (14). Estos autores demostraron que el acetato marcado con deuterio o con ^{13}C se incorporaba a esteroides precipitables con digitonina en cortes hepáticos de rata. Aparentemente otros tejidos como riñón, intestino, testículos y bazo eran incapaces de llevar a cabo tal síntesis. Algo más tarde, sin embargo, con la introducción de ^{14}C -acetato, Szere y cols. demostraban que este precursor era activamente incorporado a esteroides, "in vitro" por tejidos tan diversos como intestino, testículo, riñón, piel y cerebro, así como en hígado (15). Más aun, los porcentajes de radiactividad recuperados en la fracción de esteroides precipitables con digitonina eran casi tan grandes en piel y tracto gastrointestinal como en los cortes hepáticos. Simulta

neamente Popjak y Beeckmans (16) demostraban la colesterogénesis extra hepática en animales intactos . Estos estudios se han confirmado reiteradamente en diversos laboratorios, siendo hoy notorio que prácticamente la totalidad de los tejidos de mamíferos, son capaces en cierto grado al menos, de sintetizar colesterol "de novo" (17, 18). No obstante, a raíz de estos primeros estudios comparativos, también se hizo evidente que esta capacidad está muy desigualmente repartida. De los estudios sistemáticos llevados a cabo "in vitro" en rata y mono (19, 20) resultó que las mayores velocidades de síntesis de esteroides por unidad de peso de tejido correspondieron a dos órganos: hígado e intestino delgado y dentro de este último, sobre todo, al ileon. Las velocidades de síntesis en las restantes vísceras torácicas y abdominales eran considerablemente menores. Las más bajas se registraron en músculo y en sistema nervioso central de animales adultos. En cerebro, no obstante, la escasa actividad sintética es solo característica del tejido adulto. En neonatos, sin embargo, la actividad de incorporación de acetato a esteroides es mucho mayor, excediendo incluso los valores encontrados para el hígado y éste es un hecho que también se observó muy pronto (15).

Cuando las velocidades de incorporación se refieren al órgano no completo se encuentra que, frente al resto de los tejidos corporales, la primacía de ambos órganos continúa siendo patente. En el mono ardilla (19) se ha calculado en un 97% la contribución del hígado y del tracto gastrointestinal sobre la actividad biosintética total de este primate (respectivamente, 74% y 8%).

La extrapolación de estos datos obtenidos "in vitro", al animal intacto es de todas formas polémica. Mientras que son numerosos los trabajos que intentan evaluar la velocidad de síntesis de esteroides en hí-

gado y en otros tejidos extrahepáticos mediante incorporación de diferentes precursores radiactivos, no se ha hecho durante bastante tiempo, una evaluación de los numerosos problemas teóricos y prácticos inherentes a este tipo de medidas (21). Algunos autores han señalado que cuando se utilizan sustratos marcados con ^{14}C en preparaciones de células intactas, existe siempre la posibilidad de subestimar la velocidad de síntesis de esteroides, bien por causa de la entrada de sustrato en la célula, bien porque su metabolismo a acetil-CoA sea limitante o bien porque la actividad específica del sustrato (o la del acetil-CoA generado por él) se diluya excesivamente en la célula (21).

Concretamente para el ^{14}C -acetato, Dietschy ha señalado (22) que, además de los errores asociados con la dilución intracelular que tiene lugar, aparece una limitación adicional con la presencia de un paso parcialmente limitante de la velocidad de su metabolismo, previo a la HMG-CoA reductasa. Para el mencionado autor, la activación del acetato en el citosol podría ser dicha etapa limitante. Otros autores han confirmado tal posibilidad, indicando que la incorporación de acetato a colesterol y ácidos grasos puede variar de manera absolutamente independiente de la velocidad de biosíntesis de estas sustancias (23).

A raíz de estos planteamientos se están revisando los significados de algunos hechos ya consolidados anteriormente. Así por ejemplo, mientras que está bien establecido que la síntesis hepática del colesterol varía considerablemente con la dieta y es inhibida por el ayuno o por dietas ricas en colesterol (24, 25), la secreción interna de este compuesto, medida por método del equilibrio isotópico en animales intactos, sufre tan solo ligeros cambios bajo numerosas circunstancias dietéticas y no se modifica

cuando se añade colesterol a la dieta (26). Asimismo, mientras que en ho mogenados hepáticos, las velocidades de incorporación de precursores marcados son mayores en ratas hembras, las velocidades de síntesis de colesterol, determinadas "in vivo" por el mencionado método del equilibrio isotópico, son menores en este sexo. Finalmente hay que señalar que algunos estudios recientes no concuerdan con el hecho, generalmente asumido, de que el hígado constituye la mayor fuente de colesterol endógeno (27, 28, 29). Se ha estimado en rata que más de 4 mg diarios de colesterol sintetizado por el tracto intestinal y secretados al lumen podrían reabsorberse junto con el colesterol de la dieta (27), lo que representa para este animal casi una tercera parte de la secreción interna total. Aunque las cifras de contribución intestinal son muy variables, es probable que el papel del in testino deba ser reconsiderado en un futuro próximo (30).

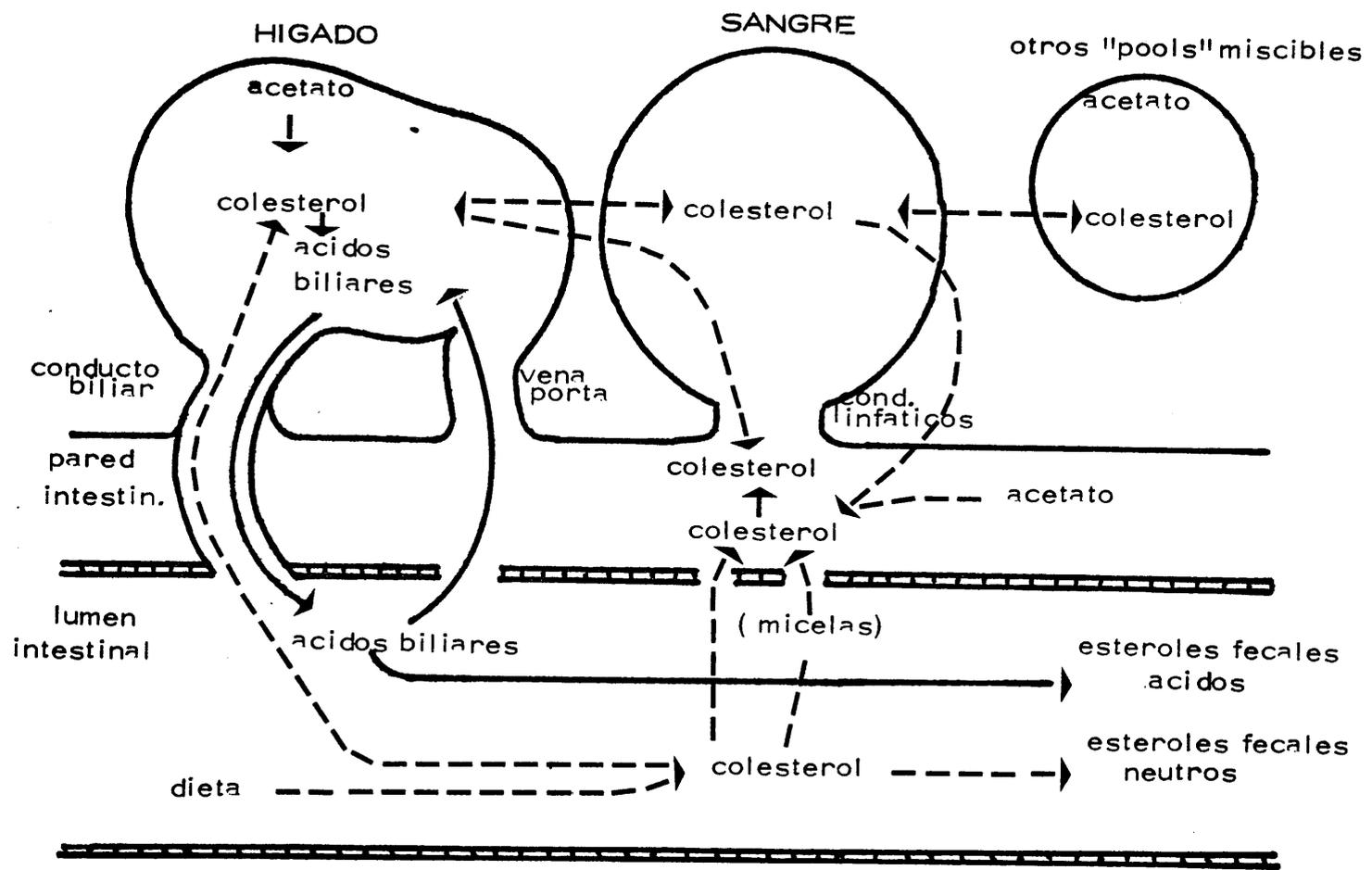
1. 1. 2. 2. - Absorción.

La absorción del colesterol presente en la dieta constituye la segunda de las entradas al espacio de transferencia. Desde el punto de vista dinámico y tras la ingestión de alimento, un análisis del contenido gá strico revelaría que no todo el colesterol presente procede del exterior, si no que éste se encuentra mezclado con colesterol endógeno excretado y se secretado en la saliva y fluidos gástricos (31). Una vez alcanzado el lumen intestinal donde tendrá lugar la absorción, el contenido gástrico recibe una nueva aportación de colesterol endógeno, esta vez de origen biliar e intestinal. A este nivel el colesterol se presenta principalmente en forma libre debido a la acción de la colesterol esterasa pancreática (31, 32).

Como ha podido demostrarse en rata (27) y en pollo (33), es

ta mezcla no es homogénea sino solo parcial, lo que justifica que los coe
ficientes de absorción sean también diferentes para cada una de las fuen
tes mencionadas (excreción, secreción y dieta), encontrándose que en am
bos orígenes se absorbe una fracción mayor de colesterol endógeno (27, 33).
De hecho parecen distinguirse en el lumen intestinal dos compartimentos:
uno "intermediario" constituido por el colesterol endógeno, intercambia-
ble con el de las células intestinales y un "compartimento axial" que con-
tiene una mezcla de colesterol intestinal y del procedente del contenido es
tomacal (27). La mayor absorción del colesterol endógeno podría deberse
a que es secretado sobre todo en la bilis, en la que ya se encuentra en es
tado micelar, mientras que el colesterol exógeno debe ingresar en las mi
celas antes de ser absorbido. Esquema 1.

Los mecanismos de entrada del colesterol micelar desde el
lumen hasta la mucosa intestinal y del transporte intracelular subsecuente
no son bien conocidos. El segundo de estos procesos parece estar vin-
culado al de los ácidos grasos de cadena larga, que migran hasta los túbu
los del retículo endoplasmático formando parte de estructuras que podrían
ser quilomicrones en formación (34). La síntesis de triglicéridos y la for
mación de quilomicrones ocurre probablemente en el retículo endoplasmá-
tico localizado sobre el núcleo (35, 36). Dentro de la célula intestinal, el
colesterol se intercambia entre los quilomicrones y estructuras subcelula
res (37). Parte del colesterol de los quilomicrones es esterificado antes
de que éstos sean secretados a través de la membrana basal (35, 38). En
el espacio extracelular los quilomicrones adsorben colesterol libre y pro
bablemente también esterificado (37, 39). Hay también intercambio de coles
terol de las células intestinales con el lumen y con los espacios extracelu
lares (40); asimismo se han detectado transferencias de colesterol entre



esquema 1

el plasma y los fluidos extracelulares, en uno y otro sentido (37, 41, 42).

En cuanto a la localización del proceso, parece que hay acuerdo en asignar al yeyuno un papel preferente en la absorción del colesterol en rata. Algunos autores, no obstante, han señalado que mientras que el colesterol biliar endógeno es absorbido esencialmente por el yeyuno, la absorción del colesterol de la dieta tiene lugar, en este animal, a todo lo largo del intestino delgado y preferentemente en su segundo y tercer cuartos (43). En pollo, Sklan y cols. utilizando $^{91}\text{YCl}_3$ como sustancia de referencia, no absorbible, han comprobado que con una dieta exenta de colesterol, el principal sitio de absorción para el colesterol endógeno es la sección proximal del intestino delgado, comprendiendo el duodeno y el yeyuno superior. Cuando la dieta se suplementa con un 0,5% de colesterol, el lugar más activo en la absorción se traslada hacia el yeyuno (44, 45, 146).

Los mecanismos que regulan estos procesos no son bien conocidos. Se han descrito numerosos factores que pueden modificar la absorción de colesterol; factores tales como la edad y el sexo (46), la naturaleza de los ácidos grasos de la dieta (48), flujo biliar (47), estado del tiroides (49), etc. Se ha comprobado repetidamente que el tamaño del "pool" de ácidos biliares tiene un gran efecto sobre la absorción de colesterol: mediante fístula biliar se detiene prácticamente la absorción de colesterol (48, 50, 51), mientras que la ingestión de ácidos biliares con la dieta, la aumenta (51, 52). Este efecto ha sido atribuido al papel de los ácidos biliares en la solubilización micelar del colesterol en el lumen intestinal y también a sus efectos sobre el paso desde las células intestinales hasta la linfa (47, 53). No obstante, para concentraciones de taurocolato en la dieta, superiores al 4%, el coeficiente de absorción del colesterol decrece (52).

Esta y otras observaciones indican que se necesita algo más que un mecanismo tan simple para explicar el papel de los ácidos biliares en la regulación de la absorción del colesterol. Algunos autores opinan que el paso limitante del proceso podría ser precisamente el movimiento de la mucosa intestinal hasta la linfa (54).

Mediante técnicas isotópicas de estado estacionario se ha puesto de manifiesto que mientras en algunos mamíferos (rata y perro) la mayor parte del colesterol circulante es de origen exógeno y procede de la dieta, en otros (primates, incluido el hombre) el predominio del colesterol endógeno es mayor (47). No obstante, dadas las características de este tipo de técnicas, las conclusiones apuntadas, según los propios autores, han de ser tomadas con reserva.

1.1.3.- Salidas del espacio de transferencia.-

1.1.3.1.- Excreción y secreción externa.

El mecanismo por el que el colesterol circulante penetra en el lumen intestinal no está claro todavía. Antes de los trabajos de Sperry en la década de los veinte (55) se creía que el colesterol biliar era la única fuente de colesterol fecal. Sperry demostró que la exclusión de la bilis del tracto gastrointestinal de perro no disminuía la concentración de lípidos insaponificables en heces. Este fenómeno fué probado también en rata (56) y en hombre (57). Se comprobó incluso que la fistula biliar en rata incrementaba unas dos veces la excreción fecal de esteroides neutros (56).

Estos estudios demostraban que el colesterol luminal puede provenir no solo de la bilis sino también de otras fuentes endógenas extra-hepáticas. Shoenheimer (58) sugirió que este colesterol podía derivar de la descamación de las células mucosales. La existencia de estas dos únicas fuentes de colesterol intestinal endógeno parece bien respaldada en el caso del hombre (59). No obstante, diversos estudios posteriores han mostrado que el colesterol sintetizado por el intestino aparece muy rápidamente en el lumen, tras la administración de acetato marcado; hecho difícilmente explicable sobre la base de la descamación de las células epiteliales (60). Es posible, por tanto, que la secreción y excreción de colesterol por estas células tenga cierta relevancia.

Las estimaciones cuantitativas de cada uno de estos procesos es notablemente difícil. Se ha calculado que la contribución biliar podría situarse en torno a 2-3 mg/día en la rata. Puesto que la mayor parte del colesterol biliar (60-80%) es reabsorbido, es razonable admitir que la bilis no contribuye más de una tercera parte de la excreción fecal de colesterol (27, 61). En apoyo de esta suposición, cuando se alimentan ratas con una dieta al 2% en colestiramina o colesterol se observa que la excreción fecal de colesterol es de tres a cuatro veces mayor que en los controles, pero sin embargo, la salida de colesterol en bilis o no cambia, o sufre tan solo un ligero incremento (52, 62).

Teniendo en cuenta el mayor coeficiente de absorción del colesterol endógeno y el hecho de que probablemente la descamación así como la secreción y excreción de colesterol por parte de las células epiteliales tiene lugar a todo lo largo del tracto gastrointestinal (27, 47), en gran parte después de los lugares donde la absorción es más activa, es evidente

que los esteroides fecales neutros deben proceder fundamentalmente de la dieta y del intestino. En una serie de experimentos, Chevallier y Lutton (27) estimaron que el flujo diario de colesterol endógeno que entra en el lumen es, para la rata, de 11 mg/día. Si se supone que el "villi" contribuye en un 20% del colesterol luminal total y que el "turnover" celular del epitelio es de unas 30 horas (63), la contribución endógena de la descamación de la mucosa epitelial debe ser de unos 3 mg/día. Es decir, al menos un 50% del flujo de colesterol endógeno que entra en el lumen es debido al intercambio de colesterol entre las células epiteliales y el lumen.

En el hombre, la excreción de colesterol endógeno parece constituida solo por el colesterol excretado; es decir, no hay contribución de colesterol fecal secretado externamente (64). Asimismo, la eliminación de colesterol en forma de esteroides fecales neutros es semejante a la de ácidos biliares (47, 65, 66), en tanto que en la rat a la excreción de colesterol es relativamente baja, comparada con la de ácidos biliares.

La excreción fecal de colesterol esta influenciada por numerosos factores y resulta interesante destacar que bajo la mayor parte de las condiciones nutricionales descritas por los autores, se encuentra en razón inversamente proporcional al coeficiente de absorción del colesterol (67). Asimismo, el volumen diario de secreción fecal externa de colesterol aumenta, en rata, cuando el coeficiente de absorción disminuye. Este paralelismo entre excreción y secreción externa sugiere que tanto el colesterol transferido desde el plasma, como el colesterol sintetizado son regulados por un mecanismo similar. No obstante, cuando se representa la secreción fecal externa frente al coeficiente de absorción, la pendiente de la línea de regresión es menor que en el caso de la excreción, y la extrapo-

lación a un valor teórico de absorción 0% da un valor de secreción muy próximo al calculado por otros métodos en animales controles (27). Esta observación puede indicar que el flujo de colesterol secretado desde el lumen al intestino es razonablemente constante e independiente de las condiciones nutricionales.

1.1.3.2. - Transformación a ácidos biliares.

La transformación de colesterol a ácidos biliares constituye el otro mecanismo cuantitativamente importante de la regulación del "turnover" del colesterol en el cuerpo (68, 69). Otros procesos como la descamación de la piel y el pelo, la conversión a hormonas esteroideas y la eliminación en la orina no poseen gran peso específico en la dinámica global aunque no se descarta que puedan ser importantes en algunos estados patológicos. (47).

Como es sabido, los ácidos biliares sintetizados en el hígado son secretados, vía bilis, al lumen intestinal. donde, según la especie, pueden sufrir eventuales transformaciones químicas a cargo de la flora microbiana intestinal. Mediante inyección simultánea de ³H-mevalonato y ¹⁴C-colesterol, adsorbido sobre proteínas autólogas, practicada intravenosamente en ratas anestesiadas con fenobarbital, se ha comprobado que el colesterol recientemente sintetizado es mejor sustrato para la biosíntesis de ácidos biliares que el colesterol que alcanza el hígado vía lipoproteínas plasmáticas (70).

La cantidad de ácidos biliares sintetizada cada día "de novo"

a partir del colesterol no es suficiente para llevar a cabo su importante papel en la asimilación de las sustancias liposolubles de la dieta. No obstante, el organismo dispone de un mecanismo de reciclaje que permite que el "pool" de ácidos biliares, relativamente pequeño, pueda ser reutilizado varias veces, cada día, durante el proceso de digestión de las grasas. La eficacia de esta denominada "circulación enterohepática" está relacionada directamente con la eficacia del proceso de reabsorción intestinal(47).

Parece que esta absorción de ácidos biliares tiene lugar a todo lo largo del tracto gastrointestinal mediante diferentes mecanismos(71). Diversos estudios parecen confirmar que la absorción en el intestino delgado proximal se lleva a cabo mediante difusión pasiva (72, 73, 74). En general este proceso es más lento conforme aumenta la polaridad y el grado de ionización del ácido (75). En el ileon, por el contrario, Weiner ha comprobado (72) que el transporte de ácidos biliares es predominantemente un proceso activo, hecho que ha sido igualmente confirmado por otros autores (73, 74). También en este caso, las características cinéticas del proceso están estrechamente relacionadas con la estructura química particular de cada ácido biliar, encontrándose que la velocidad es mayor cuando la molécula está conjugada y cuanto mayor es su grado de hidroxilación (76). La absorción a lo largo del colon es presumiblemente despreciable ya que, bajo condiciones fisiológicas, solo una pequeña cantidad de ácidos biliares alcanzan el intestino grueso.

Es interesante destacar, a la vista de estos resultados, que aquellos ácidos biliares que son difícilmente absorbidos mediante difusión pasiva en el intestino proximal (por ejemplo, los trihidroxilados y conjugados), son activamente transportados a velocidades máximas en el

ileon. Recíprocamente, las velocidades de transporte activo en el intestino delgado terminal son mucho más bajas para los ácidos que pueden absorberse fácilmente mediante difusión pasiva (47).

No existen datos acerca de la cantidad precisa del "pool" que se reabsorbe por cada ciclo de la circulación enterohepática en cada una de estas localizaciones. No obstante existen indicios de que el ileon debe tener suma importancia. La resección de la mitad distal del intestino delgado provoca un aumento del "turnover" de ácidos biliares, mientras que la resección del yeyuno no está asociada, aparentemente, con alteraciones de esta índole (77, 78, 79, 80).

Tras su absorción por la mucosa intestinal, los ácidos biliares penetran tanto en el sistema venoso portal como en los vasos linfáticos. Sin embargo, teniendo en cuenta la mayor capacidad de recepción de la sangre portal así como su flujo, que es casi 500 veces mayor que el de la linfa intestinal, se calcula que más del 99,9 % de la absorción se lleva a cabo mediante el citado sistema venoso portal (81).

Tanto en el hombre como en los animales de laboratorio, la transformación de colesterol en ácidos biliares subyace a un complejo mecanismo de control. Se cree que existen, al menos, dos sistemas "feedback" implicados en el proceso: uno controlado por la cantidad de ácidos biliares que alcanza el hígado vía circulación enterohepática y otro, por la cantidad de colesterol absorbido.

Respecto al primero de estos sistemas existen numerosas pruebas experimentales: La fístula biliar incrementa los niveles de excreción de ácidos biliares por encima de los valores controles (82, 83, 84).

La administración de colestiramina, una resina sintética, no asimilable, capaz de unirse a los ácidos biliares, incrementa asimismo su excreción (85). La administración de ácidos biliares suprime en el hombre la producción endógena; en tanto que la ilectomía la incrementa tanto en humanos (86), como animales (77).

El mecanismo por el que se articula este sistema feedback no está claro, aunque existen evidencias de que podría tratarse de un conjunto de efectos coordinados a nivel de los enzimas limitantes de las rutas biosintética y degradativa del colesterol, esto es, de la HMG-CoA reductasa y la colesterol 7 α -hidroxilasa (87). Dietschy ha sugerido que el control puede estar determinado por algunos efectos indirectos de los ácidos biliares sobre la absorción de colesterol o sobre la formación de quilomicrones y que tanto la formación de colesterol como su degradación podrían estar bajo control directo de la cantidad de colesterol que alcanza el hígado desde el tracto gastrointestinal (47).

En cuanto al segundo de los sistemas "feedback", el controlado por la cantidad de colesterol absorbido fué demostrado primeramente en perro por Abell y cols. (88), y más tarde en rata (89, 90). Este mecanismo parece esencial para prevenir situaciones en que la aportación de colesterol en la dieta es inesperadamente elevada. Así por ejemplo, cuando el incremento de ácidos biliares que se produce en respuesta a una dieta rica en colesterol, se inhibe con tiouracilo, sobreviene una hipercolesterolemia muy acusada en rata y perro (88). En el conejo, sin embargo, en que tal mecanismo compensatorio no existe, la alimentación con dietas suplementadas con colesterol generan igualmente niveles anormalmente elevados de colesterol en sangre (91). Parece probable, por consiguiente,

que se trate de un proceso adaptativo para mantener el equilibrio dinámico del colesterol en el cuerpo (52).

La situación en el hombre es peor conocida. Se sabe que la velocidad de excreción de colesterol es comparable a la de producción de ácidos biliares (92, 93, 94), y que estos últimos parecen poder sintetizarse por más de una ruta (95). De cualquier modo la conversión de colesterol a ácidos biliares no parece ser afectada por cantidades elevadas de colesterol en la dieta (96). La "inadaptabilidad" del proceso podría explicar la frecuente disfunción del equilibrio dinámico del colesterol en el hombre (30). Finalmente, las interrelaciones entre absorción y síntesis son aún bastantes confusas (96, 97).

1.1.4- Efecto de la alimentación sobre el "turnover" del colesterol

En mamíferos, el efecto que los componentes de la dieta poseen sobre el flujo de colesterol a través del espacio de transferencia ha sido ampliamente tratado en sus aspectos dinámicos generales, aunque se dista mucho aún de conocer los mecanismos íntimos mediante los que tales efectos tienen lugar. Los trabajos realizados sobre dietas suplementadas con colesterol, colestiramina o ácidos biliares, dietas purificadas y ayuno son particularmente ilustrativos acerca de la enorme influencia de la alimentación sobre el balance corporal del colesterol.

El efecto inhibitor que una dieta rica en colesterol tiene en rata sobre la biosíntesis endógena de este compuesto, determinada "in vitro" mediante cortes hepáticos, fue puesta de manifiesto por Taylor y

Gould ya al comienzo de la década de los cincuenta (98, 99) y confirmada posteriormente repetidas veces (100, 101, 102). Para explicar este efecto se han propuesto diversos mecanismos (103): la limitación de la absorción intestinal en humanos (103, 104) y la supresión de la síntesis de colesterol endógeno e incremento de la excreción fecal de ácidos biliares en rata (102, 106, 89) y perro (98, 100, 88) son algunos ejemplos de ello.

Raicht y cols. (111) han estudiado en ratas el efecto que sobre los distintos parámetros de "turnover" del colesterol tienen dietas suplementadas, alternativamente, con 0.8 % de β -sitosterol y colesterol al 1.2 %. Han comprobado que el coeficiente de absorción sufre un fuerte incremento (de 1.2 a 70 mg/día) que es compensado en parte por una inhibición de la biosíntesis hepática y un incremento en la velocidad de conversión de colesterol a ácidos biliares. Simultáneamente tiene lugar un ligero incremento de la excreción de esteroides neutros de origen endógeno. A pesar de la adaptación, sin embargo, en estos animales tiene lugar un acúmulo de colesterol hepático. Estos efectos se tradujeron a nivel enzimático en un descenso del 80 % en la actividad HMG-CoA reductasa y un incremento del 61 % en la actividad colesterol 7 α -hidroxilasa. El β -sitosterol, por su parte, provoca un descenso en el coeficiente de absorción de colesterol asociado a un incremento de su síntesis, pero no introduce cambios en la velocidad de transformación a ácidos biliares. La actividad reductasa se incrementó dos veces y la 7 α -hidroxilasa no sufrió modificación alguna (111). Otros tejidos no muestran una supresión tan marcada en la síntesis de colesterol (20).

Según Dietschy (47), las diferencias interespecíficas arrancan fundamentalmente de variaciones en la absorción y en la excreción.

Para este autor, cuando un animal ingiere una dieta pobre en colesterol virtualmente todo el aporte procede de la síntesis endógena y la salida del espacio de transferencia tiene lugar, a partes iguales, mediante excreción de esteroides neutros y de esteroides ácidos. En los animales cuya capacidad de absorción de colesterol exógeno es, como en el hombre, muy limitada, el enriquecimiento de este compuesto en la dieta incrementará muy poco su espacio de transferencia y la excreción y degradación permanecerán prácticamente inalteradas. En especies como el conejo donde la capacidad de absorción es elevada y no existen tales mecanismos compensatorios, una ingesta elevada de colesterol conduce a una expansión indefinida del espacio de transferencia. Finalmente en el caso de la rata o el perro, la capacidad para absorber colesterol exógeno, relativamente elevada, puede ser compensada por inhibición de la síntesis endógena, incrementándose paralelamente la formación de ácidos biliares, por lo que su espacio de transferencia se estabilizará en niveles superiores a los normales, y en ellos, la excreción de esteroides fecales ácidos superará con creces la de esteroides neutros.

Ho y cols. han investigado la capacidad y la reversibilidad de almacenamiento de colesterol en distintos órganos de perro, rata y conejo sometidos a dieta prolongada de colesterol. Encontraron que la mayor parte de los tejidos de conejo presentan acúmulo de colesterol bajo este tratamiento, pero no así los de rata y perro. Una vez restituida la dieta estandar no suplementada con colesterol observaron que en un periodo de 3 a 6 meses se eliminó el exceso en todos ellos excepto en aorta y piel, donde la eliminación fue mas lenta e incompleta. A raíz de ello, los autores especulan acerca del papel que juega esta característica de la aorta en la patogenia de la aterosclerosis (112).

En otro orden de cosas, el efecto de la colestiramina es también conocido a grandes rasgos. La administración oral de esta sustancia provoca en ratas un incremento tanto de la síntesis de colesterol como de su degradación a ácidos biliares a nivel de sus respectivas etapas limitantes, posiblemente, como consecuencia de la retirada de estos de la circulación enterohepática que esta sustancia provoca (87). En cerdos hipercolesterolémicos, la colestiramina reduce con gran efectividad las concentraciones de colesterol plasmático así como la retención corporal total. Estos cambios parecen deberse a un incremento de la excreción fecal de esteroides neutros y ácidos, y también a un incremento paralelo de la síntesis de colesterol, bien correlacionada "in vitro" con la actividad HMG-CoA reductasa. El aumento de la actividad 7 α -hidroxilasa concuerda en estos animales con la cantidad de ácidos biliares fecales excretados bajo tal situación (113).

Los estudios llevados a cabo sobre los efectos de la suplementación de ácidos biliares en la dieta no hacen sino confirmar el potente efecto inhibitor de la colesterogénesis hepática que estas sustancias poseen, puestas ya de manifiesto mediante otro tipo de técnicas (diversión biliar, resección ileal, etc.). Más controvertido es el aspecto de cuales de éstos ácidos posee mayor influencia.

Mathé y Chevallier, alimentando ratas con dieta suplementadas con un 0.5 % de ácido hiodesoxicólico durante cuatro meses han observado que la eliminación fecal de esteroides neutros sufre un incremento al que contribuyen todos los procesos inherentes al "turnover" del colesterol (no-absorción, excreción y secreción interna). Además la síntesis resultó incrementada. Con excepción de la secreción externa, según estos mismos autores, todos estos incrementos pueden explicarse en términos del descen-

so observado en el coeficiente de absorción del colesterol. Se sugiere para ello que este ácido biliar podría inhibir competitivamente la absorción de taurocolato, reduciendo la cantidad disponible de este último para la absorción de colesterol y lípidos (114). Otros autores han comprobado que el incremento de la síntesis inducido por diversión biliar en la rata puede prevenirse mediante perfusión duodenal de tauroquenodesoxicólico. El ácido taurocólico, sin embargo, no tendría efecto. Por su parte la síntesis intestinal de colesterol se reduce por taurocólico y tauroquenodesoxicólico pero no se modifica por taurodehidrocólico (115).

Finalmente, en humanos, la administración oral de quenodesoxicólico se asocia con un descenso de la saturación de la bilis en colesterol, pudiendo inducir la disolución de cálculos biliares mientras que el ácido cólico es generalmente inefectivo (116, 117, 118, 119, 120). Diversos estudios muestran que la excreción biliar de colesterol es menor durante el tratamiento con quenodesoxicólico que con cólico (121, 122) y este puede ser un factor decisivo en la desaturación de colesterol en bilis. El mecanismo exacto no ha sido clarificado, aunque algunas pruebas indican que no es probable que el descenso en la secreción de colesterol se deba a un descenso de su coeficiente de absorción (123). Mientras que algunos autores abogan por una acción directa a nivel de la HMG-CoA reductasa (124), otros opinan con Dietschy que los ácidos biliares no inhiben directamente la reductasa sino que regulan indirectamente la síntesis de colesterol mediante cambios en el flujo a / o desde el hígado (125, 126). Recientemente se ha sugerido que la reducción en la saturación biliar de colesterol podría ser el resultado de cambios en la interrelación de diferentes lípidos biliares en el lugar de su secreción (123).

El tipo de fibras presentes en la dieta puede asimismo afectar sensiblemente los diversos parámetros del "turnover" del colesterol. Mathé y cols. sugieren que los cambios en la fuente de fibra de la dieta o en la composición en sales de la misma tienen efectos moderados sobre su coeficiente de absorción (108). Niveles altos de celulosa incrementan dicho coeficiente (108) en tanto que las saponinas de la alfalfa lo disminuye (107). La excreción fecal de esteroides por ratas alimentadas con dieta estandar, o dietas semipurificadas conteniendo pectina (105) lignina (127) o alfalfa (128) es significativamente mayor que cuando las ratas consumen solamente celulosa como fibra. Algunos autores piensan que el ajuste entre las velocidades de síntesis y degradación del colesterol en respuesta a la dieta es particularmente eficiente en la rata (129). En este sentido, se ha confirmado en parte que el incremento de la excreción fecal de esteroides neutros y ácidos observado tras la administración de distintos tipos de fibras es paralelo al incremento de la síntesis de colesterol, manteniéndose así un nivel adecuado en circulación enterohepática. (129).

La influencia en las proporciones de glúcidos, lípidos y proteínas en la dieta también ha sido objeto de especial atención. Las correlaciones observadas son muy diversas. Mukherjee y cols. han encontrado en rata que la suplementación de dietas libres de grasas con linoleato disminuye la concentración de colesterol hepático y la síntesis en este órgano (130). Incrementando la cantidad de caseína en la dieta se observa un aumento de la velocidad de absorción en detrimento de la síntesis endógena (131, 48). Las restricciones calóricas en la dieta provocan una reducción del colesterol plasmático en humanos hiperlipoproteinéuticos (133) y en ratas obesas (134). La glucosa administrada a ratas ayunadas durante 36-40 horas causan una marcada estimulación de la colesterogénesis hepática y de la colesterol 7 α -hidroxilación. Bajo estas mismas condiciones se incrementa la excreción

tanto de colesterol como de ácidos biliares (135).

Recientemente, Jugano y cols. han descubierto que el patrón biosintético intestinal de colesterol puede también modificarse por el tipo de dieta, de tal modo que, aunque estudios previos indican que el ileon es el lugar más importante de la colesterogénesis intestinal, una dieta purificada con sacarosa como única fuente de carbohidratos puede entre los 7 y 10 primeros días, eliminar el gradiente biosintético yeyuno-ileal presente bajo dietas comerciales. Encuentran que, en efecto, la actividad específica de la HMG-CoA reductasa yeyunal es significativamente mayor que la ileal. Las modificaciones en la composición de la fibra y su naturaleza, así como en la fuente de carbohidratos no consiguen modificar esta respuesta. Los autores concluyen que la colesterogénesis intestinal debe estar controlada por una gran variedad de componentes de la dieta (136).

El efecto inhibitorio de la colesterogénesis que posee el ayuno fué puesto de manifiesto primeramente por Tonkins y cols. (148) y confirmado reiteradamente en otros laboratorios (19, 20, 137, 138). Como en el caso de la alimentación con dieta de colesterol, aquí también se tienen pruebas de que la acción se produce a nivel de la etapa limitante, la reducción del HMG-CoA (87, 139). El efecto del tipo de dieta durante la realimentación en ratas ayunadas durante periodos más o menos largos de tiempo también ha sido estudiado. Se tienen evidencias sobre la influencia de dietas libres de grasas (140, 141) y dietas grasas (142). Craig y cols (140) mostraron que la respuesta en la colesterogénesis hepática era marcadamente distinta entre ratas realimentadas con una dieta libre de grasas y una dieta no purificada que las contenga. Estos autores mostraron que en el primer caso, la HMG-CoA reductasa y la síntesis de esteroides se incrementaban hasta el tercer

día alcanzando niveles comparables a los controles no ayunados, para declinar entonces rápidamente hasta niveles muy bajos en los días 5-6 (140, 141). Por otra parte, en las ratas realimentadas con dietas no purificadas la actividad continuó incrementándose hasta restaurarse en los niveles de preayuno después de los días 5 y 6.

En aves, tanto el "turnover" del colesterol como los efectos que sobre él poseen los factores de la dieta son bastante menos conocidos. Estructuralmente, el contenido tisular del colesterol parece ser en pollos muy semejante al de mamíferos, a excepción del cerebro, donde la concentración es menor (143). Bajo dieta continuada de colesterol puede inducirse en ellos aterosclerosis experimental (144).

Sklan y Budowsky, han comprobado recientemente en pollos que la colesterogénesis hepática a partir de acetato se deprime tanto "in vitro" como "in vivo" a los siete días de tratamiento con una dieta de colesterol o taurocolato, incrementándose mediante suplementación de colestiramina en la dieta. La colesterogénesis intestinal, según estos autores se deprime "in vivo" solo por taurocolato, mientras que "in vitro" desciende bajo dieta de colesterol. Por su parte, la conversión de colesterol a ácidos biliares aumenta con dieta de colesterol y colestiramina y disminuye por taurocolato (145).

En pollos jóvenes, el coeficiente de absorción desciende cuando se suplementan fitosteroles a la dieta (33). Los esteroides de soja reducen considerablemente la circulación enterohepática de colesterol y ácidos biliares por decremento, al parecer, de la absorción ileal de estas sustancias (146).

Finalmente, Subbiah y cols. (147) han examinado el efecto que las restricciones en la dieta tienen sobre el colesterol plasmático y sobre el balance corporal de este compuesto en pichones jóvenes. Encontraron que después de un mes de tratamiento el colesterol plasmático se incrementa significativamente para decrecer después a los tres meses, a los niveles iniciales. Ellos atribuyen este efecto al incremento de flujo de colesterol desde los tejidos a la sangre durante la pérdida de peso. La excreción fecal de esteroides neutros se redujo significativamente, tanto al mes como a los tres meses de restricciones dietéticas, mientras que la excreción fecal de ácidos biliares no sufrió cambios significativos, indicando que poseen diferente control metabólico.

1.2. - REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL: PAPEL CENTRAL DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Los primeros estudios llevados a cabo al comienzo de la década de los años cincuenta evidenciaron que la biosíntesis del colesterol está regulada principalmente por tres variables fisiológicas (47). La cantidad de colesterol en la dieta, el aporte calórico de la misma y la circulación enterohepática de los ácidos biliares (98, 99, 148, 149, 150). Desde entonces y como ya se ha mencionado en parte, se han descrito muchos otros factores implicados en la regulación (factores dietéticos y hormonales, lipoproteínas, etc.) cuya significación fisiológica es más difícil de precisar.

Los trabajos de Taylor y Gould (98, 99) pusieron claramente de manifiesto que una dieta rica en colesterol suprime virtualmente la colesterologénesis hepática. Períodos de tan solo 12 horas causan una considerable depresión en la síntesis hepática de esteroides, siendo la inhibición prácticamente completa, en la rata, a las 48 horas. Otros tejidos no muestran un descenso tan acusado en su actividad sintética (20, 99, 100, 161). Solamente en dos tejidos extrahepáticos se han encontrado efectos significativos. Takeuchi y cols. (162) han demostrado que la incorporación de acetato a colesterol en médula ósea de conejo se deprime cuando se alimentan los animales con una dieta rica en colesterol durante dos semanas. Bailey (163), por su parte, ha encontrado un efecto semejante incubando linfoblastos y fibroblastos de ratón en presencia de colesterol. Hay que reseñar, no obstante, que el único tejido cuantitativamente importante en el balance global de esteroides cuya colesterologénesis es rápida y eficazmente suprimida bajo una dieta de colesterol es el hígado.

Si se consideran las aportaciones totales de cada órgano a la biosíntesis endógena de colesterol, se sigue que en animales sometidos a este tipo de tratamiento, el tracto gastrointestinal, y en particular el íleon, se convierte en el lugar más importante para la síntesis de esteroides.

A raíz de las observaciones iniciales de que la interrupción del flujo biliar provocaba un rápido aumento de la colesterogénesis hepática (149) e intestinal (150) se hizo patente que alguno de los componentes de la bilis poseía un importante papel en el control de la síntesis de esteroides en ambos órganos. Algunos autores sostienen que la acción de los ácidos biliares en el hígado sería indirecta (47). Según este modelo la síntesis hepática de colesterol sería controlada por la cantidad de este compuesto que alcanza el hígado desde el lumen intestinal. Ahora bien, teniendo en cuenta que para que se lleve a cabo la absorción se necesita el concurso de los ácidos biliares (50) y asimismo se requiere su presencia para el paso de colesterol intestinal hacia la linfa (166, 53), el tamaño del "pool" de ácidos biliares determina, en definitiva y de un modo indirecto, la velocidad de síntesis hepática de colesterol. Aunque para estos autores la colesterogénesis intestinal, en contraste con la situación en hígado, podría estar regulada directamente por ácidos biliares (47), recientes estudios indican que también en este caso la acción podría derivar de su sola función como portadores de colesterol bajo condiciones fisiológicas, en tanto que sería esta sustancia la que tendría un efecto concreto y directo sobre la etapa limitante de su propia síntesis (164).

El ayuno por su parte también evidencia en rata una fuerte inhibición en la síntesis hepática de esteroides (apdo. 1.1.4). En otros tejidos, incluido el tracto gastrointestinal, el efecto observado es bastante

menor o incluso inexistente (47).

Aunque, como ya se ha dicho, estos hechos se conocieron al comienzo de la década de los años cincuenta, hubo que esperar no obstante a que se clarificasen las reacciones iniciales de la ruta para conocer que etapas estaban implicadas en cada uno de estos mecanismos. Los trabajos posteriores de Gould y Popjak (151) y de Bucher y cols. (152) demostraron que la conversión de ^{14}C -mevalonato a colesterol en hígado de ratas alimentadas con dieta suplementada con este último permanecía inalterada, cuando sin embargo bajo esas condiciones, la incorporación de ^{14}C -acetato a colesterol estaba fuertemente inhibida. Estos resultados implicaban que la regulación tenía que darse antes de la formación de mevalonato. El fenómeno fue investigado posteriormente por Siperstein y Guest (106). Estos autores comprobaron que los cortes hepáticos procedentes de animales alimentados con una dieta rica en colesterol podían incorporar ^{14}C -acetato a dióxido de carbono, ácidos grasos y cuerpos cetónicos a velocidades próximas a las de los controles a pesar de que la síntesis de colesterol en ellos estaba casi completamente suprimida. A partir de estos datos dedujeron que el punto de inhibición debía ser precisamente la reducción del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato. Ello canalizó la atención sobre la HMG-CoA reductasa como centro de la regulación de la biosíntesis del colesterol.

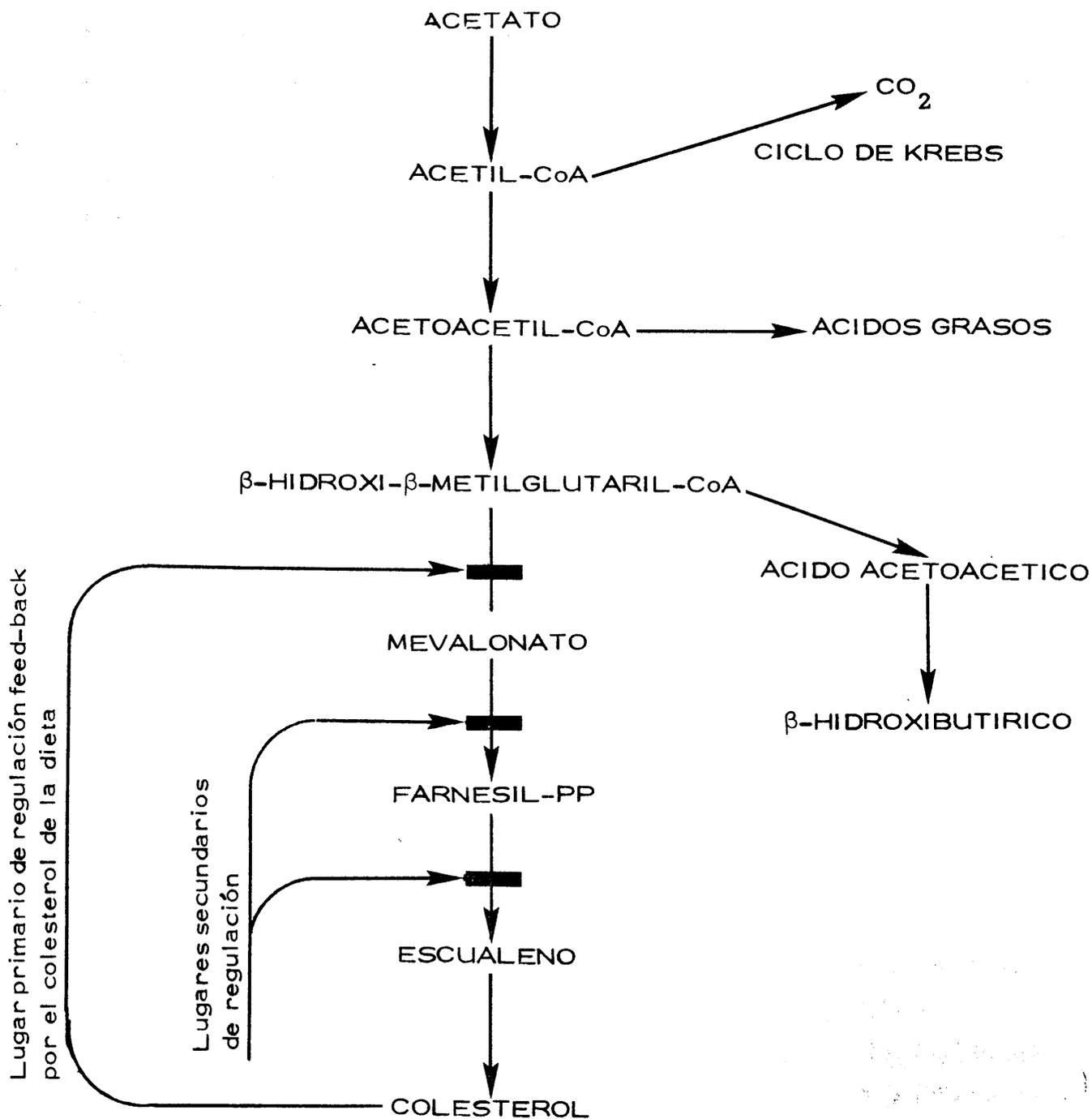
Ciertamente, parte de las premisas en que se apoyaba esta conclusión no estaban justificadas (154), entre otras cosas porque los datos habían sido interpretados asumiendo la existencia de un único "pool" de HMG-CoA, común para la cetogénesis y para la colesterogénesis (155). En este esquema, en apariencia solidamente respaldado por la evidencia experimental, la formación de mevalonato constituye el punto de ramificación para

ambas rutas. Se trata además de una reacción que se sabía irreversible. Por todo ello la HMG-CoA reductasa parecía el candidato más probable para la regulación de la biosíntesis del colesterol.

Hoy se sabe sin embargo que aunque el HMG-CoA es a la vez precursor tanto de la formación de cuerpos cetónicos como de la síntesis de esteroides, ambas rutas se llevan a cabo en compartimentos celulares diferentes (mitocondrial y extramitocondrial respectivamente) e involucran asimismo "pools" diferentes de intermediarios y de enzimas (156), lo que sitúa a la tiolasa citoplasmática en el punto de ramificación que antes se asignaba a la reductasa y obligando al replanteamiento del problema.

Multitud de nuevos datos, no obstante, ha puesto de manifiesto que aunque las presunciones de Siperstein y cols. no parecen ser correctas, la conclusión propiamente dicha es válida. Actualmente prevalece la opinión de que la HMG-CoA reductasa es, bajo la mayor parte de las condiciones fisiológicas, la enzima clave de la regulación de la colesterologénesis hepática (157, 141, 159, 160). La conclusión precedente es, además probablemente válida para una amplia gama de sistemas aparte de los tejidos hepáticos de rata (159). Esquema 2.

La biosíntesis de colesterol presenta variaciones diurnas de velocidad que han sido puestas de manifiesto en hígado (168, 169) e intestino de rata (170) durante la pasada década. Los primeros estudios indicaron que solamente la HMG-CoA reductasa muestra cambios de actividad significativos y paralelos a los de incorporación de acetato a esteroides. Estudios más recientes parecen indicar que la incorporación de mevalonato a colesterol por cortes hepáticos podría asimismo variar en función de la hora del día con-



Esquema 2.

trariamente a lo que se supuso en principio (171). Este hallazgo ha llevado a Shama Bhat y cols. a postular la existencia de otro paso posterior a la reductasa y que se hace limitante de la velocidad a media noche (171). No obstante hay que señalar que la existencia de ritmos diurnos a otros niveles es polémica: mientras que algunos autores encuentran variaciones horarias en la actividad PPMVA-descarboxilasa (167) y aún en etapas posteriores a la formación de escualeno (165) otros datos, igualmente recientes, contradicen estos resultados (158, 174).

La existencia de otros puntos de regulación en la ruta distintos al catalizado por la HMG-CoA reductasa no puede descartarse desde luego. En este sentido, las actividades tiolasa y sintasa extramitocondriales (153) así como la conversión de mevalonato en farnesil-PP y de este último a escualeno (157), sufren descensos en animales alimentados con dietas ricas en colesterol. Gran parte de las enzimas implicadas en la conversión de HMG-CoA en escualeno disminuyen sus actividades bajo condiciones de ayuno, alcanzando de nuevo los valores iniciales durante la realimentación (141). Mediante estudios de incorporación de precursores marcados, Wiss y cols. han demostrado la existencia de un lugar de regulación, posterior a la formación de escualeno (132) que sería también afectado por el ayuno (110). Slakey y cols. a partir de los cambios observados en la incorporación de MVA a colesterol y el comportamiento de las enzimas intermediarias indican que existen, al menos, dos lugares secundarios de regulación (141).

No obstante, las variaciones debidas a la HMG-CoA reductasa son suficientes para explicar los cambios observados en la incorporación de acetato a colesterol "in vitro" (141). Por otra parte, los cambios detectados en las restantes enzimas no son tan intensos ni tan rápidos como las

modificaciones sufridas por la reductasa bajo análogas condiciones por lo que los mencionados puntos de regulación precedentes o subsecuentes a la reducción del HMG-CoA parecen tener una importancia secundaria (159).

Los conocimientos que en aves se tienen, a este respecto, son practicamente nulos. Tampoco son numerosos los datos acerca de animales en desarrollo. Ramachandran y cols. han probado que la descarboxilación del PPMVA es un paso limitante de la incorporación de MVA a escualeno en ratas lactantes. Dicho enzima es inhibido en un 50-80 % cuando se alimentan ratas destetadas con dieta de colesterol al 1 % (109).

1.3. - ESTUDIO DE LA HMG-CoA REDUCTASA

1.3.1. - Distribución y localización de la enzima

Aunque la HMG-CoA reductasa debe estar presente en todos los tejidos de mamíferos capaces de sintetizar IPP, su actividad ha sido ampliamente citada solo en hígado, tejidos intestinales, piel, leucocitos circulantes, linfocitos esplénicos, cerebro en desarrollo y células tumorales hepáticas. Mientras que la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en roedores, la actividad reductasa se ha medido recientemente en fibroblastos humanos de la piel (222), leucocitos humanos (223) y muestras de biopsias hepáticas humanas. La HMG-CoA reductasa está también presente en cultivos de líneas celulares de mamíferos, levadura, neurospora y en ciertas cepas bacterianas que incluyen pseudomonas y un actinomicete (159).

En células de mamíferos, la HMG-CoA reductasa existe exclusivamente en la fracción de membranas microsomales del homogenado celular. Alrededor del 80 % parece estar asociado con la fracción membrana correspondiente al retículo endoplasmático liso, Aparato de Golgi y membrana plasmática (224). Mitropoulos y cols. recientemente han señalado, sin embargo, que dentro de la fracción microsomal su reparto no es homogéneo, sino que se presenta, junto con la colesterol 7 α -hidroxilasa en las fracciones de retículo endoplasmático rugoso con ribosomas de baja densidad, las membranas lisas, procedentes del aparato de Golgi y membranas plasmáticas no contendrían, según estos autores cantidades apreciables de ninguna de las dos enzimas (225).

1. 3. 2. - Solubilización de la HMG-CoA reductasa microsomal

El estudio detallado de muchas de las propiedades cinéticas y físicas de la HMG-CoA reductasa requiere su aislamiento libre de materiales membranosos extraños. La solubilización de la HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado de rata ha sido abordada mediante varias técnicas. Linn (226) ha descrito una extracción tamponada de unos polvos acetónicos y Kawachi and Rudney (227) publicaron más tarde un procedimiento de solubilización por desoxicolato. Puesto que otros investigadores han encontrado estos procedimientos difíciles de reproducir, se han desarrollado otros métodos alternativos.

Varios de estos se basan en congelamiento y fusión de las membranas microsomas. Brown (228) ha descrito un procedimiento de congelación rápida de los microsomas en nitrógeno líquido; Heller y Gould (229) los congelan lentamente (8°-10° por minuto) y Ackerman (230) congela los microsomas rápidamente y los liofiliza después.

Aunque las actividades reportadas varían considerablemente, todas estas técnicas de congelación-descongelación solubilizan una fracción aproximadamente igual: 20-30 % de la actividad reductasa microsomal presente en un principio.

Heller y Gould (200) han indicado que la repetición de su procedimiento de congelación-descongelación lenta con las membranas microsomas residuales dobla el rendimiento de la actividad reductasa solubilizada. La actividad específica de esta segunda fracción solubilizada es 3-5 veces mayor que la de la reductasa inicialmente solubilizada. Un mayor rendimiento de

actividad solubilizada (70 %) se ha obtenido también por incubación de los microsomas congelados-descongelados en glicerol al 50% (228).

En aves, Beg y cols (185), también mediante procedimientos de congelación-descongelación, han conseguido rendimientos aún mas elevados.

Aunque el 50 % de las proteínas microsomales totales son también liberadas, el 90 % de la actividad reductasa puede ser solubilizada por tratamiento con fosfolipasa de preparaciones crudas de veneno de serpiente. Además, cuando los microsomas se incuban en CIK 4 M a temperatura ambiente, por encima del 80 % de la actividad reductasa se solubiliza lentamente. Para incrementar este rendimiento más aún, el tratamiento con CIK se combina con un paso previo de congelación-descongelación (228).

Un hecho común a varios procedimientos de solubilización es el aparente "desenmascaramiento" de la actividad reductasa. Frecuentemente más del 100 % de la actividad reductasa microsomal presente inicialmente se recupera cuando se determinan ambas fracciones: soluble y microsomal residual (227, 218, 200, 229). Las razones de esto no se conocen. La solubilización puede incrementar la accesibilidad del sustrato al enzima cuando la estructura de la membrana está total o parcialmente desorganizada. Alternativamente, las moléculas existentes pueden pasar a formas más activas o bien inhibidores de la actividad reductasa pueden perderse durante la solubilización (159).

Las preparaciones solubilizadas de HMG-CoA reductasa de hígado de rata tienen un peso molecular de unos 200.000 aproximadamente

(228, 229). Puesto que la electroforesis en gel dodecil sulfato sódico de la reductasa solubilizada con desoxicolato y la solubilizada con CIK 4M sugieren subunidades de unos 65.000, se ha propuesto la existencia de un trímero. Preparaciones de reductasa solubilizadas por técnicas diferentes exhiben un pH óptimo similar y valores de Km para HMG-CoA y NADPH también similares, estos a su vez difieren ligeramente de las preparaciones de reductasa microsomal. Ciertas propiedades de la HMG-CoA reductasa dependen de si el enzima está ligado a membrana o solubilizado.

Aunque la reductasa microsomal es relativamente insensible al calor o al frío, varias preparaciones solubilizadas de reductasa son extremadamente sensibles a ambos. Más aún, la sensibilidad a la temperatura de preparaciones solubilizadas por diferentes procedimientos varía ampliamente. La reductasa solubilizada por fosfolipasa de veneno, extracción con CIK, o congelación-descongelación seguida de extracción con glicerol, adquiere la propiedad de labilizarse irreversiblemente con el frío (159).

A menos que esten presentes concentraciones extremadamente elevadas de CIK (4M) o de glicerol (50 %), la HMG-CoA reductasa pierde rápidamente actividad a 4°C.

Ni HMG-CoA ni NADPH previenen esta pérdida de actividad inducida por frío. Aunque la disociación de la enzima es una posibilidad, el mecanismo de esta inactivación irreversible por frío no se conoce.

No obstante, la reductasa solubilizada por el método de congelación-descongelación lenta de Heller y Gould (229) es reversiblemente inactivada por frío. Puede conseguirse una completa restauración de actividad por incubación a 37°C, la recuperación aparente de actividad solubili-

zada alcanza de un 27 % a un 56 %. Contrariamente a la inactivación por frío observada por Brown et al (228), Heller y Gould han visto que el NADPH ó NADP , pero no ClK 4 M protege contra la inactivación por frío (200). Puesto que las preparaciones de reductasa purificadas 150 veces se inactivan por frío y se reactivan mediante tratamiento con calor, estos autores han sugerido que la inactivación reversible por frío debe ser una propiedad intrínseca de la reductasa solubilizada. Ellos postulan que la HMG-CoA reductasa puede existir en forma activa e inactiva, y que el frío disocia la forma activa en subunidades ocurriendo además una pérdida de actividad.

Mientras que se carece de una evidencia convincente, las observaciones que son consistentes con esta hipótesis incluyen: (1) La reductasa solubilizada por congelación rápida a -80° y calentamiento rápido no pierde ninguna actividad. Si la disociación es un proceso relativamente lento, la congelación y descongelación rápidas pueden por ello evitar la disociación . (2) La activación por calor de reductasa inactivada por frío es más eficiente a elevadas concentraciones enzimáticas . (3). Los datos preliminares de filtración por geles sugieren que la reductasa activada por calor tiene un peso molecular significativamente mayor que las preparaciones inactivadas por frío (159).

Alguna forma de sensibilidad al frío puede ser una propiedad intrínseca de todas las preparaciones de reductasa solubilizada. Ciertamente ningún procedimiento de solubilización ha proporcionado enzima en que se haya podido demostrar concluyentemente insensibilidad al frío, incluso en la reductasa solubilizada por desoxicolato. Mientras que no se ha mencionado ninguna sensibilidad a la temperatura en los estadíos primeros de purifica-

ción, se ha encontrado una activación por calor a 37°C en purificación avanzada. Aunque no se ha citado, la activación por calor sugiere que puede también darse inactivación por frío.

Ackerman y cols (230) han reportado que sus preparaciones de reductasa solubilizada no son sensibles al frío. No obstante sus datos excluyen la inactivación irreversible por frío pero no la reversible. La reductasa solubilizada por su procedimiento causa sólo una ligera pérdida de actividad cuando se almacena a 0°. No obstante sus condiciones de determinación, que incluyen una preincubación a 37°C durante 20 min, podría ser mas que suficiente para reactivar reversiblemente la reductasa inactivada por el frío (159).

No está claro por qué solo la reductasa solubilizada por los tres métodos desarrollados por Brown y cols (228) parecen ser irreversiblemente inactivada por frío. Estos autores, no presentan datos para la inactivación por frío de la reductasa solubilizada por simple congelación-descongelación de microsomas. Por eso no se sabe si el tratamiento con ClK o glicerol usados para incrementar el rendimiento, confiere irreversibilidad. Junto al hecho de ser lábil por frío, la reductasa solubilizada por estos métodos es estable al calor en presencia de ClK 4 M, una propiedad no mencionada para otras preparaciones solubilizadas.

La sensibilidad variable a la temperatura que exhiben las distintas preparaciones solubilizadas pueden estar relacionadas con la presencia o ausencia de lípidos o fragmentos de membrana. Estas fracciones, si están presentes, deben ser pequeñas ya que los pesos moleculares aparentes de las diferentes preparaciones solubilizadas de reductasa, no difie-

ren significativamente (228, 229). La elucidación de los factores responsables de estas propiedades variables pueden incidir en la naturaleza de la enzima "in situ."

1.3.3. - Ritmo diurno de actividad

La ritmicidad es una propiedad fundamental de la materia viva. Tanto en las simples células como en los organismos complejos, innumerables estructuras y procesos sufren cambios periódicos de forma o velocidad (231). El papel de tales ritmos en la organización temporal y la homeostasis de los bioprocesos, debe enmarcarse en el contexto de lograr una mayor eficacia, mediante la adaptación y sincronización del organismo a las fluctuaciones periódicas del entorno que facilitan su integración en el medio (232). De acuerdo con numerosos autores (232, 233, 234), el término "ritmo circadiano" debe reservarse para aquellas oscilaciones generadas endógenamente y cuyos periodos sean de 24 horas, en tanto que el término "ritmo diurno" se aplicaría a aquellos cambios de igual periodo, pero que responden a un agente sincronizador externo. Como se verá más adelante, las variaciones rítmicas de la actividad HMG-CoA reductasa dependen estrechamente de factores externos, tales como la ingesta, por lo que, en lo sucesivo, aludiremos en ellas como ritmos diurnos.

La existencia de un ritmo diurno en la HMG-CoA reductasa fue citada primeramente en hígado de ratón (203) por Kandutsch y cols en 1969 y poco después demostrado en hígado de rata intestino de rata (170) y ciertos hepatomas de rata y ratón.

Posteriormente ha sido confirmado en muchos laboratorios. No obstante, la existencia de variaciones rítmicas de la actividad reductasa en otras especies, particularmente en la humana, o en otros tejidos, no se ha establecido (159).

De las enzimas que catalizan la conversión de acetato en escualeno, sólo la HMG-CoA-reductasa exhibe un ritmo diurno (141). De la PP-MVA-descarboxilasas los datos que se tienen son bastantes confusos (158, 167) y sólo de otra enzima de la ruta metabólica del colesterol, la colesterol 7- α -hidroxilasa, se ha confirmado la existencia de un ritmo diurno. Esta enzima cataliza la primera reacción en el catabolismo del colesterol a ácidos biliares.

Para discutir ritmos diurnos es conveniente distinguir entre cuatro parámetros, que son:

- 1.- El valor de la actividad promedio a lo largo de un ciclo completo.
- 2.- La amplitud de ritmo o diferencia relativa entre las actividades del pico y del nadir.
- 3.- El periodo del ritmo o el número de horas que dura una oscilación completa.
- 4.- La fase del ritmo. Se refiere a las horas del día en que tiene lugar las actividades del pico y del nadir.

En principio, cada uno de estos parámetros puede variar independientemente de los otros. Para el valor medio, amplitud y fase del ritmo,

esto ocurre de hecho.

El ayuno provoca un gran descenso de los niveles medios de actividad reductasa sin efectos significativos sobre los otros parámetros. (168, 203). Una dieta de colestiramina, al contrario, incrementa principalmente el nivel medio del ritmo en la síntesis del colesterol. Un gran incremento en la amplitud del ritmo sigue al destete (205) y un gran descenso ocurre por ablación o destrucción de ciertas glándulas endocrinas (221). La fase del ritmo puede alterarse controlando los periodos de luz y oscuridad o mediante la dieta (207). Aunque no se dispone de ningún dato que ilustre sobre cambios en la periodicidad del ritmo de la HMG-CoA reductasa, posiblemente podría ser alterado por cambios artificiales en la duración de los periodos de luz y oscuridad (159).

1.3.3.1.- Efectos de la luz y la dieta.

En ratas alimentadas "ad libitum" y expuestas a un patrón normal de iluminación (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), la actividad de la HMG-CoA reductasa de hígado e intestino es mínima durante la fase luminosa y alcanza el máximo alrededor del punto medio de la fase oscura. La amplitud de las oscilaciones es más pronunciada en hígado que en intestino.

La HMG-CoA reductasa de hígado de ratón se comporta de forma cualitativamente parecida, aunque el máximo de actividad se da hacia el final de la fase luminosa, muchas horas antes que en rata (203, 235).

En ratas alimentadas "ad libitum", la fase del ritmo (osea hora del día en que se da la actividad máxima) puede ser modificada ajustando el cronometraje de los periodos luz-oscuridad (236, 169), por lo que se usa frecuentemente para facilitar la experimentación. Otra alternativa, aunque menos conveniente, para ajustar la fase del ritmo puede ser la manipulación de la dieta tal como alimentar con comidas discretas (169). Todo esto no puede utilizarse no obstante para afirmar que la luz u oscuridad o la presencia o ausencia de comida son los factores causales primarios para el ritmo diurno de la actividad reductasa.

1. 3. 3. 2. - Causas del ritmo

Regulación de la síntesis de la reductasa. - El colesterol, las hormonas y ciertos otros factores administrados a o retirados de ratas intactas o monos tiene efectos espectaculares ampliamente conocidos, alterando rápidamente las velocidades de colesterogénesis hepática a partir de acetato (154). En casi todos los casos se ha podido demostrar que estos efectos se deben a cambios en la velocidad de conversión de HMG-CoA a mevalonato.

Inicialmente, los efectos sobre la HMG-CoA reductasa fueron atribuidos a la estimulación o inhibición de su actividad catalítica. El hecho de que esta interpretación debía revisarse fue sugerido por el descubrimiento de que los incrementos y decrementos de actividad reductasa que caracterizan el ritmo provienen de la síntesis y degradación de enzima. Esto sugirió que varios efectores podían también actuar alterando las velocidades de síntesis y degradación de la reductasa.

La rápida síntesis de la HMG-CoA reductasa fue primeramente vislumbrada por la capacidad de los inhibidores de la síntesis proteica de bloquear el máximo diurno de actividad reductasa y de síntesis de colesterol. El rápido "turnover" de la reductasa fue pronto confirmado por técnicas más definitivas. Higgins encontró que mientras la actividad catalítica específica de la reductasa, solubilizada y purificada, de hígado de rata permanece constante a lo largo del ciclo diurno, la incorporación de (³H)-leucina en la proteína (218) y los materiales precipitados por anticuerpos anti reductasa purificada (237) aumentan y caen bruscamente, en fase con la variación diurna de actividad reductasa.

El incremento en la velocidad de la síntesis de reductasa precede al aumento en actividad en un intervalo significativo y la síntesis rápida persiste durante un cuarto de día de 24 horas (218). Por análisis cinético de los datos de actividad, Dugan y cols (169) han calculado que la velocidad de síntesis de reductasa aumenta 10 veces cuando su actividad comienza su ascenso diurno.

El incremento diurno de la síntesis de reductasa parece apoyarse en un periodo preliminar de síntesis de novo de ARN (238). La administración de actinomicina D a ratas entre 5 y 9 horas antes del pico normalmente observado, suprime el aumento de la actividad reductasa. El periodo requerido para la síntesis de ARN parece estar limitado ya que la inyección de actinomicina D, 15 horas antes o después de la hora que precede al pico diurno no suprime la actividad reductasa. Edwards y Gould (238) han observado que la actinomicina D también interfiere con la ingestión y asimilación de alimento. Sin embargo, atribuir a la actinomicina D estos efectos no parece ser consistente con la evidencia de Dugan y cols (169) de que en las

ratas con comidas anticipadas, el aumento de la actividad reductasa ocurre incluso si se les niega la comida.

Regulación de la degradación de la reductasa .- El que la velocidad de degradación de la reductasa esté sujeta también a regulación es menos evidente. La semivida aproximada del declive en actividad reductasa en ratas normales (169, 236, 206, 218) o en ratas adrenalectomizadas (240) es de 2-4 horas, sobre el declive diurno en actividad reductasa de hígado de rata se ha reportado tanto que es bloqueado por cicloheximida, como que no es afectado por dicho antibiótico (236). Además el declive de la actividad reductasa hepática parece no ser afectado por actinomicina D (238).

El declive correspondiente de actividad reductasa en hígado de ratón es bloqueado por puromicina ó actinomicina D pero no por cicloheximida (235).

Mientras que algunos de estos resultados son consistentes con la degradación de reductasa por una proteasa lábil, los datos cinéticos e isotópicos sugieren que la velocidad de degradación de la reductasa en ratas no tratadas permanece esencialmente constante a lo largo del ciclo diurno (218). Actualmente, por tanto, no se ha establecido ningún esquema de regulación de la degradación de la reductasa.

Cambios en los horarios de iluminación y alimentación , - El cronometraje del ciclo luz-oscuridad en ratas alimentadas "ad libitum" o de las comidas en ratas con alimentación temporizada determina solamente la fase del ritmo de la HMG-CoA reductasa.

En ratas normales, el ritmo persiste bajo luz u oscuridad continuas (241) y en ratas con alimentación temporizada, la actividad empieza a aumentar ligeramente antes del comienzo de las comidas o se anticipa (169).

Puesto que ni el ciclo de iluminación ni la ingestión de alimento disparan el ritmo, factores intrínsecos tales como cambios rítmicos en niveles hormonales son probablemente los responsables de ello.

Efectos hormonales. - Entre las hormonas implicadas tanto en el mantenimiento del ritmo diurno de la síntesis de reductasa como en la regulación global de la síntesis de colesterol se incluyen insulina, glucagón, hormona tiroídica e hidrocortisona.

Antes de exponer la evidencia existente acerca del control hormonal del ritmo diurno de la reductasa debe tenerse en cuenta que todos los datos representan medidas de actividad reductasa y no de concentración de reductasa. Consiguientemente, no puede descartarse por el momento el posible papel de las hormonas en la modulación de la actividad.

Aunque en fases tempranas todavía, los trabajos sobre los efectos hormonales en la actividad reductasa progresan rápidamente. Las evidencias indican que la insulina y la hormona tiroídica pueden intervenir en la cadena de eventos que inician y mantienen el incremento de velocidad de síntesis de reductasa que caracteriza la porción ascendente del ritmo (242, 221, 243) mientras que la hidrocortisona y el glucagón, posiblemente vía c-AMP pueden estar involucradas en la cadena de eventos que termina la síntesis de reductasa.

Hay una evidencia considerable acerca de la implicación de insulina en el ritmo diurno de la reductasa. En ratas normales, el nivel sérico de insulina sufre una variación diurna que coincide temporalmente con el ritmo de la HMG-CoA reductasa (243, 221). En ratas diabéticas por streptococina, el valor de la actividad reductasa es muy bajo y la variación en amplitud parece ser esencialmente abolida después de 7 días (221). La actividad normal y amplitud son gradualmente restauradas durante un periodo de 4 días mediante inyección diaria de una forma de insulina de liberación retardada (221). Ya que las variaciones de los niveles de insulina, en ratas diabéticas tratadas con insulina, son presumiblemente diferentes de los de ratas normales, la insulina puede actuar más como una hormona permisiva que como un regulador directo del ritmo. No obstante es posible que esté implicada en la iniciación del ritmo, ya que una dosis grande de insulina liberable rápidamente inyectada a ratas normales o diabéticas durante el periodo bajo diurno, eleva rápidamente la actividad reductasa al pico normal diurno (242, 243).

El glucagón puede estar también involucrado en la regulación del ritmo diurno de HMG-CoA reductasa: por inyección de glucagón varias horas antes del pico diurno se suprime el incremento diurno en un 50 % (244, 221, 243).

Puesto que la inyección de glucagón previa o simultánea a la de insulina, suprime el rápido incremento de actividad observado cuando se inyecta la insulina sola, el glucagón puede antagonizar la respuesta de la reductasa a la insulina (244, 242). La hormona tiroídica puede requerirse para la expresión del ritmo diurno. La hipofisectomía reduce extensamente la actividad reductasa y parece abolir el ritmo (240, 244, 243), y la inyección de triyodotironina a ratas hipofisectomizadas eleva la actividad reductasa a valores supranormales no sujetos a variaciones diurnas. (245)

Otras hormonas afectadas por la hipofisectomía (glucocorticoides por ejemplo), pueden no obstante, ser responsables del control del ritmo diurno. Puesto que aún no se han publicado datos para ratas deficientes sólo en hormona tiroidea, su papel preciso no puede deducirse por ahora.

Como se ha mencionado, la administración de insulina a ratas diabéticas eleva rápidamente la actividad reductasa y restablece la amplitud normal del ritmo (221). La insulina, no obstante, no eleva la actividad reductasa en ratas hipofisectomizadas (243) ni en ratas diabéticas e hipofisectomizadas (244). Esto sugiere que la hormona tiroídica se requiere para el efecto de la insulina sobre la reductasa y sugiere también que la hormona tiroídica puede requerirse para la expresión del ritmo (243). No obstante, deben tomarse precauciones a la hora de evaluar el papel de la hormona tiroídica a partir de estas experiencias ya que la velocidad de síntesis del colesterol puede restaurarse en ratas hipofisectomizadas mediante otros factores diferentes de la hormona tiroídica (por ejemplo con una dieta rica en carbohidratos, inyección de hormona del crecimiento)(159).

Los resultados de experimentos de adrenalectomía, aunque conflictivos, sugieren que las hormonas adrenales están involucradas en el control del ritmo diurno. Se ha mencionado que la adrenalectomía disminuye la amplitud del ritmo de la actividad reductasa (240) y de la colesterogénesis hepática o, alternativamente, que no tienen ningún efecto sobre el ritmo de la reductasa. (221). Estas discrepancias aparentes no están aún resueltas.

La adrenalectomía no permite diferencias entre los efectos debidos a glucocorticoides y los debidos a las catecolaminas. No obstante, la inyección de hormonas sí que permite esta distinción y ha proporcionado mayor información al respecto.

Aunque las catecolaminas elevan la actividad reductasa (240, 246) no existe ninguna evidencia acerca de que tenga un papel en el ritmo. Contrariamente, los glucocorticoides pueden estar involucrados en el control del ritmo previniendo el incremento de la actividad reductasa. La inyección de hidrocortisona a ratas normales provoca la abolición del ritmo (221) y la inyección de hidrocortisona bloquea además la elevación de actividad reductasa por insulina en ratas diabéticas y por triyodotironina en ratas hipofisectomizadas (244).

Se ha observado, estudiando la estructura fina del ritmo diurno de reductasa que el máximo realmente se presenta desdoblado en dos. El incremento de actividad de ambos picos es bloqueado por inyección de cicloheximida de aquí que requieran presumiblemente de la síntesis proteica (159). Existe la posibilidad de que los niveles de una o más hormonas implicadas en el control de síntesis de reductasa (proteína) puedan estar sometidos a cambios rítmicos de carácter bifásico.

En hepatocitos dispersados se han observado cambios de actividad reductasa evocadores del ritmo diurno (247). La actividad reductasa de los hepatocitos aislados de ratas matadas durante el periodo luminoso

es baja. La actividad se incrementa cuatro veces tras incubación durante 3 horas, declinando entonces hasta 2.5 veces el valor inicial durante otras 6 horas. Recíprocamente la actividad reductasa en hepatocitos de ratas matadas en la mitad del periodo oscuro es inicialmente alta, decrementándose en un 30 % después de incubarlos durante 3 horas y un 80 % en 6 horas.

Los hepatocitos aislados de ratas matadas en el máximo diurno deben tender a disminuir la actividad reductasa. Análogamente, los hepatocitos aislados en el nadir tienden a elevar la actividad reductasa. Estos resultados sugieren que el ritmo en hígado parece estar programado por acontecimientos previos a la extracción del hígado. (159).

Estas preparaciones de hepatocitos dispersos pueden ofrecer ventajas únicas para penetrar en el mecanismo detallado de la regulación del ritmo diurno de la reductasa.

1.3.3.3. - Desarrollo del ritmo diurno

Un ritmo diurno de la actividad reductasa, presente en ratas lactantes durante el estadio más temprano estudiado (6 días de edad) persiste a lo largo del desarrollo. Antes del destete el ritmo aparece invertido de tal manera que el máximo de actividad tiene lugar en el punto medio de la fase luminosa. Esta inversión ocurre probablemente porque las ratas maman durante el día, y, al menos para ratas adultas, el momento de la alimentación puede determinar el momento en que se alcanza el máximo. La amplitud del ritmo (2 veces) es baja en relación al de adultos y presenta un parecido mayor con la reductasa intestinal del adultos. Poco después las ratas adoptan

un patrón de alimentación adulta y el ritmo se aproxima al de adultos en fase y amplitud. Los niveles de nadir, no obstante, son inicialmente mayores (205).

Los cambios en la actividad reductasa que ocurren durante el desarrollo son demasiado grandes para poder ser atribuidos a cambios en la amplitud o fase del ritmo diurno. El cambio rítmico de 5 a 10 veces en ratas adultas es minimizado por el incremento de actividad que sigue al destete. En ratas destetadas 21 días después del nacimiento, la actividad en el nadir aumenta 70 veces desde el mediodía del día 22 al mediodía del día 24. El incremento total de actividad desde el mediodía (nadir) hasta la medianoche (máximo) del día 22 es mayor incluso, y representa una duplicación de la actividad reductasa cada 110 minutos. Un ritmo adulto esencialmente normal se establece entonces. Los niveles de actividad del nadir continúan no obstante aumentado durante los días 23 y 24 hasta que exceden de los valores adultos y no descienden a los valores normales adultos hasta el día 30 (205).

El incremento de actividad que sigue al destete parece deberse en parte al incremento de la síntesis de reductasa y en parte a otros procesos. El aumento desde los niveles inferiores de lactación a los del nadir adulto normal no es bloqueado por cicloheximida. Sin embargo, el posterior incremento del nadir adulto normal al pico de actividad del cachorro próximo a la media noche es bloqueado. Por tanto el aumento inicial parece implicar otros procesos distintos a la síntesis, posiblemente un aligeramiento de la inhibición de la actividad reductasa o conversión a una forma catalíticamente más activa (159).

Aunque la presencia de colesterol en leche materna de rata (6 mg de colesterol por gramo de sólidos), y su ausencia en la comida de rata puede ser un factor en las bajas actividades reductasas presentes durante la lactancia y en el extraordinario incremento que sigue al destete, el colesterol libre y total hepático permanece entre los 0 y 30 días en 10 % de los niveles adultos. Ello no podría impedir, no obstante, un cambio significativo en el contenido en colesterol en un orgánulo tal como el núcleo. De otra parte, cambios en la síntesis de colesterol endógeno, pueden ser suficientes para mantener un nivel constante de colesterol hepático a despecho de los cambios de entrada a través de la dieta.

Tanto la leche de rata como el citosol hepático de las ratas lactantes contienen compuestos que inhiben la actividad reductasa hepática microsomal de ratas adultas medida in vitro (205). Estos inhibidores no son dializables y son relativamente termoestables. La relación, si existe, entre los inhibidores presentes en la leche y los de hígado, de ratas lactantes no ha sido aún establecida. Es posible, no obstante, que el inhibidor citosólico juegue algún papel en los cambios de la actividad que cataliza el patrón del desarrollo. Es el propio cambio en la dieta el que parece disparar el marcado aumento de la actividad reductasa que sigue al destete en el día 22 (159). Si el destete es prematuro tiene lugar un aumento sustancial de actividad reductasa antes del día 22.

Recíprocamente, si el destete es demorado por encima de 6 días, el incremento no ocurre (205).

En resumen, el complejo patrón del desarrollo de la reductasa de hígado de rata parece involucrar factores dietéticos. Ya que los

cambios en la dieta pueden afectar los niveles hormonales, parece probable que las hormonas estén involucradas a su vez en estos cambios con respecto al aumento de actividad que sigue el destete, parece reflejarse en parte en nueva síntesis enzimática, y en parte, un cambio en la actividad de la enzima (159).

1.3.4. - Modulación de la HMG-CoA reductasa.

1.3.4.1. - Regulación de la actividad y de la cantidad de enzima

1.3.4.1.1. - Hormonas

Los múltiples efectos hormonales descritos sobre la HMG-CoA reductasa han sido ya expuestos con cierta extensión en el apartado anterior. Los mecanismos mediante los que todas estas acciones se llevan a cabo son aún desconocidos. Estos mecanismos podrían implicar directa y / o indirectamente tanto cambios en la concentración de enzima como cambios de su actividad catalítica o ambas cosas a un tiempo.

Excepto la insulina, las hormonas estudiadas son también gluconeogénicas y pueden afectar también a la movilización de ácidos grasos. Los cambios en los niveles sanguíneos de glucosa y otros metabolitos pueden acarrear a su vez cambios en los niveles de otras hormonas diferentes a la inyectada (159).

Aunque se necesitan más datos para emitir un modelo plausible 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 actividad catalítica de la reductasa.
2. - Elementos permisivos. Factores que deben estar presentes para que la síntesis y / o activación tengan lugar (hormona tiroidea, posiblemente también, insulina).
3. - Elementos de control negativo. Factores que impiden un incremento, o bien originan un decremento de la síntesis y / o expresión de la actividad (hidrocortisona, glucagón).

Añadiremos finalmente que la regulación hormonal de la actividad enzimática, vía 3'-5'-AMP cíclico es un fenómeno bien establecido, y puede ocurrir con la HMG-CoA reductasa. La evidencia acumulada, sin embargo, es más sugestiva que convincente (159). El c-AMP añadido a cortes de hígado u homogenados hace descender la velocidad de síntesis de colesterol (248).

La inyección de dibutiril-c-AMP a ratas normales también inhibe el aumento diurno de actividad reductasa (221). La significación fisiológica de la inhibición de la síntesis de colesterol y de la actividad reductasa por c-AMP "in vitro" ha sido propuesta por Raskin (249), el cual observó que la concentración mínima de c-AMP necesaria para conseguir un efecto observable "in vitro" es 3 o 4 órdenes de magnitud mayor que las fisiológicas.

Estos investigadores confirman la inhibición de actividad reductasa de cortes de hígado por elevadas concentraciones de c-AMP observadas por Beg y cols. (248), pero no observaron ninguna inhibición en hígados perfundidos cuando la concentración celular de c-AMP se elevó 50 veces mediante infusión de glucagón.

En la actualidad, la información existente es insuficiente para decidir entre uno u otro patrón de interacción entre estas clases de efectos que expliquen adecuadamente la regulación hormonal de la reductasa.

1.3.4.1.- Esteroides

Como se dijo anteriormente, el colesterol de la dieta puede regular la velocidad de colesterogénesis hepática y el sitio clave de esta regulación es la reacción catalizada por la reductasa. La inhibición es específica de la colesterogénesis, de tal modo que las velocidades de metabolización del acetato a CO_2 o ácidos grasos, o las velocidades de síntesis de proteínas y ARN quedan inafectadas (140).

Muchos esteroides administrados a monos intactos o añadidos al medio de células cultivadas suprimen la actividad reductasa al menos de forma tan eficaz como el colesterol mismo. Entre los esteroides activos en monos intactos se encuentran: androsta-4,6-dien-17 β -ol-3-ona, colest-4,6-dien-3-ona, testoterona, progesterona, colesterol, colestanol y colestanonol (250). En cultivos de hepatocitos o células L, muchos esteroides oxigenados (25-hidroxi-; 20 α -hidroxi-; 7 α -hidroxi-; 22 α -hidroxi-; 22 β -hidroxicolesterol o 7-ceto- y 22-cetocolesterol) son más afectados incluso que el propio colesterol (251). Análogamente, en fibroblastos humanos, once este-

roides, particularmente los dotados de un grupo ceto o hidroxilo en posición 6, 7 ó 25, son mas potentes que el colesterol (252). Ciertos esteroides ligados a albúmina añadidos al medio de cultivo de células HTC reducen también la actividad reductasa 2-3 veces más eficazmente que el colesterol. Entre estos se incluyen dos cetosteroides (coleste-4-en-3-ona y colest-4,6-dien-3-ona) y dos colesteril-ésteres (colesteril-hidrogen-succinato y colesteril-hidrogen-ftalato) Brown and Goldstein (252) concluyen que se requiere la presencia de un oxígeno no sustituido en posición 3 del núcleo esteroídico para mostrar actividad reguladora.

Mientras que el colesterol de la pureza habitualmente empleada disminuye, rápida e intensamente la actividad reductasa de células cultivadas, el colesterol altamente purificado es menos efectivo (251). En cultivos de células L el colesterol purificado suprime la actividad reductasa tan sólo al 50 % de lo que lo hace el colesterol impuro.

En cultivos de hepatocitos primarios o establecidos, el colesterol purificado apenas suprime la actividad reductasa del todo. En células cultivadas y posiblemente en animales intactos también, una fracción significativa de la actividad atribuida al colesterol puede reflejar en realidad la actividad de impurezas. Aunque las impurezas activas de los preparados de colesterol no se han identificado aún, varios productos de oxidación que incluirían algunos de los esteroides oxigenados, inhibidores citados anteriormente, y que se acumularían cuando el colesterol se almacena expuesto al aire, estarían presentes (251).

Dos esteroides poderosamente inhibidores son intermediarios del metabolismo esteroídico animal: 7α -hidroxicolesterol que es el primer

intermediario de la formación de ácidos biliares a partir de colesterol y 20α -hidroxi-colesterol, primer intermediario en la producción de hormonas esteroideas a partir de colesterol, en las glándulas endocrinas.

La regulación de actividad reductasa por estos esteroideos debe ocurrir "in vivo". Si ello es así, la regulación de la síntesis del colesterol en diferentes órganos debe variar dependiendo de los últimos productos producidos (p. e. ácidos biliares, hormonas esteroideas) (251).

La adición de un grupo hidroxilo al colesterol en posición 7, 20, 22 ó 25 aumenta la capacidad de los esteroideos para suprimir la actividad reductasa, mientras que la introducción de un tercer grupo hidroxilo o el acortamiento de la cadena lateral C-18 en uno o dos carbonos la disminuye (251).

La conversión de colesterol a un derivado más activo, y la subsiguiente inactivación por posterior metabolismo debe considerarse, por tanto, como un mecanismo posible de la regulación esteroídica de la actividad reductasa.

La supresión de la actividad reductasa por el colesterol de la dieta, se acompaña por un incremento del contenido hepático de colesterol debido principalmente a niveles incrementados de ésteres de colesterilo. El contenido de ésteres de colesterilo, pero no de colesterol libre de las membranas microsomales, también resulta incrementado y la adición de ésteres de colesterilo al medio de cultivo de células HTC suprime la actividad reductasa más eficazmente que el propio colesterol. En cultivos de fibroblastos humanos, la adición de lipoproteínas de baja densidad suprime la actividad reduc-

tasa e incrementa también el nivel de colesteril-ésteres (253). El incremento de colesteril-ésteres de estos fibroblastos se correlaciona con un incremento de la actividad colesterol acil-transferasa. Recíprocamente, en fibroblastos de pacientes con hipercolesteremia familiar homocigótica, la LDL no suprime la actividad reductasa ni eleva los niveles de colesteril-ésteres (253).

Estos resultados sugieren que los niveles de colesteril-ésteres pueden estar inversamente relacionados con la actividad reductasa. No obstante, ni el colesterol hepático total ni los niveles de colesteril-ésteres se correlacionan en todas las circunstancias con dicha actividad y con las velocidades de síntesis del colesterol, por ejemplo, durante el desarrollo de ratas jóvenes (221). El posible papel regulador de los niveles intracelulares de colesteril-ésteres es por el momento incierto.

1.3.4.1.3. - Otros efectores

La bilis de rata contiene una proteína que inhibe la capacidad que tiene la preparación de hígado de rata para formar colesterol a partir de acetato, pero no a partir de mevalonato. La inferencia de que esta proteína actúa sobre la reductasa está apoyada por la observación de McNamara (205) de que bilis cruda de rata inhibe la actividad reductasa microsomal.

En la bilis bovina se ha encontrado también una proteína inhibidora. Una vez purificada, muestra propiedades moleculares diferentes a las de rata, lo que puede indicar que actúan a distintos niveles. La de bilis

de rata tiene un peso molecular bajo (19.000), mientras que la bovina tiene baja densidad ($p = 1.024$) y elevado peso molecular (sobre 2×10^6). Se trata de una lipoproteína cuya composición lipídica recuerda la de las β -lipoproteínas séricas. No parece ser, no obstante, una lipoproteína sérica ya que anticuerpos anti suero bovino no inactivan el inhibidor biliar bovino.

Se han descrito otros inhibidores de la reductasa aunque tampoco se conocen los mecanismos. Entre ellos están los de leche de rata y los de citosol hepático de ratas lactantes, con posterioridad se han descubierto factores que inhiben la actividad reductasa en leche humana y de vaca y en microsomas renales y hepáticos (254).

Hace ahora más de una década desde que Siperstein implicó las lipoproteínas séricas ricas en colesterol en la regulación de la síntesis hepática de colesterol.

Las lipoproteínas ricas en colesterol de hígado o suero añadidas a preparaciones libres de células no inhiben la actividad reductasa (255). No obstante, cuando se añaden al medio de cultivo celular lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o suero completo que las contenga, la actividad reductasa se deprime marcadamente (255, 256).

El factor inhibidor de las LDL y VLDL parece ser el propio colesterol, ya que la adición de colesterol disuelto en etanol a fibroblastos humanos también deprime la actividad reductasa (255). No obstante, el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), es relativamente inefectivo.

Por otra parte, suero de pacientes con abetalipoproteinaemia no suprime la actividad reductasa de fibroblastos humanos normales. Este suero contiene colesterol ligado a proteínas del tipo HDL, pero carece de apoproteína β , que es común a las LDL y VLDL. Además, de las lipoproteínas probadas, sólo las que poseen reacciones cruzadas con anticuerpos anti LDL humano suprimen la actividad en fibroblastos humanos (255). Así por ejemplo la lipoproteína de yema de huevo, a pesar de su elevado contenido en colesterol, no la suprime. Por consiguiente, la proteína a la que está enlazado el colesterol puede modificar sustancialmente la capacidad reguladora sobre la actividad reductasa.

La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en la regulación de la actividad reductasa en fibroblastos, incluye la unión de LDL a la superficie de la membrana celular mediante un proceso de alta afinidad. La cantidad de uniones de alta afinidad de LDL y subsiguiente degradación de la proteína, corre paralela con la supresión de actividad (255). Los fibroblastos de individuos con hipercolesteremia familiar homocigótica son resistentes a la supresión LDL, carecen de enlace de alta afinidad y tienen muy reducida la degradación de LDL.

Aunque parecen estar involucrados receptores de membrana para LDL, el mecanismo mediante el que la unión de LDL origina el descenso de actividad no se conoce.

La unión y degradación de LDL debe facilitar el transporte de colesterol hacia la célula, el cual, a su vez, puede suprimir la actividad reductasa. Por supuesto que el colesterol sólo puede suprimirla en fibroblastos. No obstante, el proceso debe ser más complicado, ya que

la incubación de fibroblastos de pacientes con hipercolesteremia familiar con elevadas concentraciones de LDL, lleva consigo la unión y degradación de grandes cantidades de lipoproteína mediante un proceso de baja afinidad y sin embargo, la actividad reductasa no es suprimida (257).

1.3.4.1.4. - Estado actual del problema

A menudo los conceptos primitivos que se desarrollan en un campo de investigación son discordantes a la luz de posteriores hallazgos. Menos frecuentemente, pero no raramente, trabajos aún más recientes demuestran que aquellos primeros tenían después de todo, su mérito. Hace veinte años, la noción de que la regulación de la actividad reductasa se llevaba a cabo mediante modulación de su actividad catalítica fue ampliamente admitida. Siperstein, el principal defensor de este punto de vista, sugirió que el colesterol podría actuar como un inhibidor alostérico de la HMG-CoA reductasa (106). Los numerosos intentos que se sucedieron, sin embargo, para demostrar la hipótesis, fueron infructuosos.

En 1969, los cambios de actividad reductasa que caracterizan su ritmo diurno se reconocieron como debidos, a su vez, a cambios de la velocidad de síntesis de la proteína enzimática (218). Esto permitió a muchos investigadores racionalizar los efectos de otros factores que se sabía cambiaban la actividad reductasa, como efectores de su velocidad de síntesis.

Había varias observaciones, no obstante que eran difíciles de explicar de esta manera. La cicloheximida, por ejemplo, no bloquea más que el 50 % de la actividad reductasa que sigue al destete de las ratas

jóvenes (221) y, por otra parte, los efectos iniciales de la dieta de colesterol no son satisfactoriamente explicados en términos de un descenso en la velocidad de síntesis de la reductasa, solamente, como lo testifican también los resultados que se exponen en esta Memoria. Existen además otros varios efectos que como los incrementos que siguen a la administración de insulina o epinefrina son igualmente rápidos.

Hacia 1972 se empezaron a acumular de nuevo evidencias de la modulación directa de la HMG-CoA reductasa. En el momento actual, parece que tanto la actividad como la síntesis de esta enzima están regulados aunque los mecanismos implicados no resultan aún del todo claros. Los nuevos hallazgos concernientes a la interacción de las membranas microsomales, así como los recién descubiertos mecanismos de regulación covalente, están llamados a ocupar un papel central en la investigación actual en este campo. A continuación se resumen algunos de los hechos más relevantes concernientes a estos aspectos.

1. 3. 4. 2. - Regulación por modificación covalente

Cuando se incuban microsomas aislados de hígado de rata en presencia de ATP y Mg^{2+} , antes de la determinación, se observa un rápido descenso de la actividad reductasa (195, 174, 194). Ambos aditivos son necesarios para que se de el efecto y el EDTA lo suprime. La extracción del complejo Mg-ATP de los microsomas tratados mediante centrifugaciones no revierte la inactivación (195). Los lavados de los microsomas no tratados mediante centrifugaciones repetidas previenen la inactivación Mg - ATP dependiente. No obstante, una fracción de citosol tanto de hígado de rata

(195) como de fibroblastos humanos, promueve la inactivación Mg-ATP de los microsomas lavados. El efecto del c-AMP es incierto, pero según algunos autores (195) potenciaría dicha inhibición. Asimismo, el citosol contiene factores capaces de reactivar la reductasa microsomal inactivada por Mg-ATP.

Por otra parte, la HMG-CoA reductasa sufre un incremento en su actividad cuando se preincubaban a 37° los homogenados hepáticos crudos (194) o los sobrenadantes postmitocondriales (258). Esta activación se bloquea mediante c-AMP más Mg-ATP (258) o fluoruro sódico (259). Cuando los microsomas no tratados se incuban solos no se origina ninguna activación, pero esta es promovida por la adición de factores citosólicos. El tratamiento de las fracciones citosólicas con tripsina, bloquea esta activación (194).

Todos estos hechos ha llevado a la conclusión de la existencia de un sistema enzimático fosforilante-defosforilante capaz de controlar el equilibrio de dos formas interconvertibles de la HMG-CoA reductasa: una de ellas, activa y desfosforilada, y la otra inactiva y fosforilada. Recientemente, los componentes de tal sistema, una HMG-CoA reductasa fosfatasa (260), y una reductasa cinasa (184) han sido purificadas y caracterizadas.

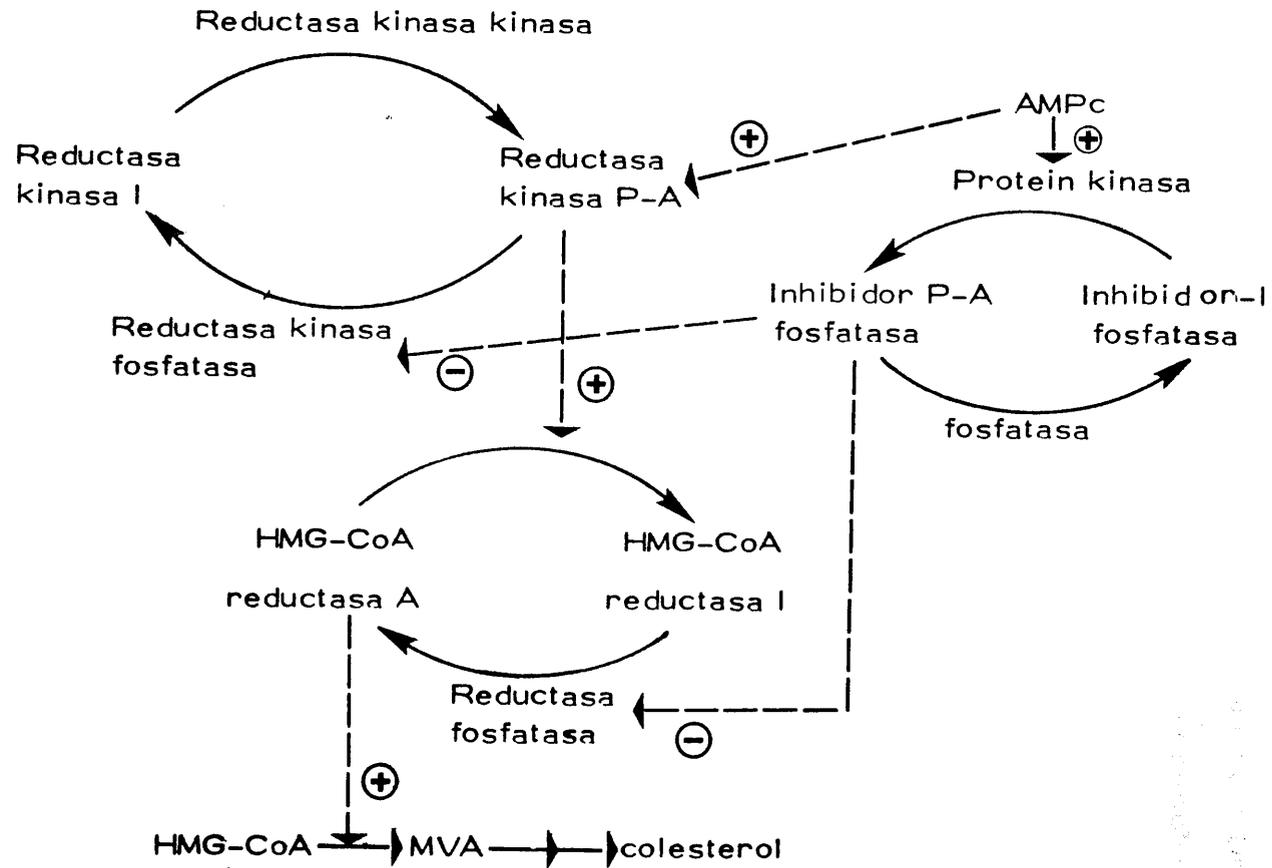
Evidencias aún más recientes indican que estas enzimas a su vez podrían poseer formas activas e inactivas interconvertible, lo que ha llevado finalmente a Beg (184) a proponer un esquema consistente en una cascada bicíclica en que tanto la reductasa como la proteína-cinasa estarían reguladas mediante fosforilación-desfosforilación. Mientras que la forma activa de la reductasa sería la desfosforilada, la proteína-cinasa sería más

activa en forma fosforilada. Este sistema sería sensible a señales endocrinas y de otro tipo. Así por ejemplo, el efecto inhibitor del c-AMP frente a la HMG-CoA reductasa "in vitro" podría ser el resultado de un incremento en la forma activa de la reductasa cinasa sensible al c-AMP. El mecanismo mediante el que actúan la insulina y el glucagón es aún incierto. Estas sustancias podrían actuar sobre el sistema descrito, vía c-AMP (184).

Por otra parte, los cambios del c-AMP intracelular pueden alterar la actividad de la proteína inhibidora de la fosfoproteína fosfatasa induciendo la desfosforilación tanto de la reductasa como de la reductasa cinasa. La presencia de esta proteína, que es capaz de ser fosforilada (forma activa) mediante una proteína-cinasa c-AMP dependiente, se ha demostrado en perro y músculo esquelético de conejo. También parece claro que la administración de insulina está asociada con la desfosforilación de muchas enzimas interconvertibles clave. No obstante se requieren datos adicionales para delimitar aún el alcance de este tipo de control. Esquema 3

1.3.4.3. - Regulación a nivel de membrana

El conocimiento de que los constituyentes lipídicos de las membranas microsomales pueden poseer un papel importante en la regulación de la HMG-CoA reductasa no se remonta más allá de cuatro o cinco años, razón por la cual, los datos acumulados son a todas luces insuficientes. Revelan ya, sin embargo, que en determinados aspectos de la regulación de esta enzima, pueden desempeñar un importante papel que ha sido completamente ignorado hasta ahora.



Esquema 3

Como es sabido, los dos componentes lipídicos más característicos de los sistemas membranosos celulares son los fosfolípidos y el colesterol. Ambos constituyentes son capaces de modificar las actividades de numerosas enzimas ligadas a membrana (260, 261). En el caso de la HMG-CoA reductasa se da la circunstancia adicional de que el colesterol es precisamente el producto final de la ruta controlada por esta enzima.

En 1976, Sabine y cols (191, 262) propusieron que, en hígado de rata, el control feedback de la biosíntesis del colesterol podría llevarse a cabo mediante cambios fisicoquímicos inducidos en la membrana microsomal por los ésteres de colesterol, principalmente, y que consistirían en una alteración de la fluidez de dichas membranas. Es ampliamente aceptado que, dadas las características estructurales de esta molécula, su inserción en las membranas biológicas lleva consigo un incremento de la rigidez de las mismas, en especial si está previamente esterificada (215, 216). Frecuentemente se considera que la relación molar colesterol : fosfolípidos constituye un buen índice de la fluidez de las membranas (190).

Mitropoulos y cols (189) han mostrado recientemente que existe un "pool" de colesterol en el microentorno de la HMG-CoA reductasa, y que el tamaño de ese "pool" influye directamente sobre la actividad de esta enzima y que para ellos es el mismo que actúa como sustrato de la colesterol 7 α -hidroxilasa. Estos autores opinan que el descenso de actividad reductasa y el incremento de actividad hidroxilasa que sigue a una inyección intravenosa de ácido mevalónico se debe a un incremento del "pool" de colesterol del retículo endoplasmático argumentando tres tipos de evidencias diferentes. En primer lugar, que la K_m aparente de la reductasa se modifica adoptando valores próximos a los presentes en ratas alimentadas con

dietas ricas en colesterol. En segundo lugar, que la representación de Arrhenius se modifica en igual sentido, hecho atribuible a la presencia de mayor cantidad de colesterol en el entorno enzimático. Finalmente que la radiactividad del 7α -hidroxicolesterol formado "in vitro" a partir de ^{14}C -colesterol fue menor en ratas inyectadas con MVA que en las ratas controles, lo que indica una mayor dilución del trazador en el primer caso debida a la presencia de mayor cantidad de colesterol en entorno.

De la posible influencia de los fosfolípidos sobre la actividad reductasa, los datos de que se dispone son aún más escasos. Suzuki y cols. (263) han comprobado en boniato, que la preincubación de los microsomas a 30° provoca una hidrólisis en los fosfolípidos constituyentes, y que existe una correlación positiva entre la formación de ácidos grasos debida a la hidrólisis, y la pérdida de actividad HMG-CoA reductasa. Estos resultados sugieren, para estos autores, que la hidrólisis de los fosfolípidos microsomales induce la inestabilidad de la reductasa por alteración de la estructura de la membrana y que la enzima requiere fosfolípidos para su actividad. Posteriormente, Finkel y cols (239) han presentado evidencia por vez primera de la perturbación de la actividad reductasa microsomal por alteración de la composición de las membranas en fosfolípidos provocada por un aminoalcohol natural. Incuban células gliales C-6 con N,N-dimetiletanolamina observando un descenso de hasta el 50 % de actividad reductasa y una disminución paralela de la síntesis de colesterol. Este descenso puede prevenirse por adición de colina al medio de cultivo. Los autores asocian el efecto con la formación de fosfatil-N, N-dimetiletanolamina acumulada a expensas de fosfatidilcolina.

No obstante, y como ya se ha apuntado anteriormente, este aspecto de la regulación de la HMG-CoA reductasa es aún prácticamente desconocido.

2. PLAN DE TRABAJO

2.-PLAN GENERAL DE TRABAJO

De acuerdo con las consideraciones expuestas en la introducción y parte teórica de esta Memoria, las principales directrices de trabajo se establecieron como se indica a continuación:

- A.- Estudio preliminar de algunas de las propiedades de la HMG-CoA reductasa de pollo, inherentes a su condición de enzima ligada a membranas microsomales.
- B.- Estudio de la evolución diurna de la biosíntesis del colesterol y del papel que en ella desempeña la HMG-CoA reductasa en hígado, asa duodenal y cerebro, bajo condiciones estandarizadas durante el desarrollo postnatal.
- C.- Establecimiento de la influencia que la suplementación de colesterol a la dieta o el ayuno poseen sobre la evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa y sobre la velocidad global de la ruta biosintética.
- D.- Estudio del efecto que los mencionados tratamientos poseen sobre el contenido en colesterol y fosfolípidos de las membranas microsomales en los tres órganos.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. - MATERIAL

3.1.1. - Material biológico

Todas las experiencias que se describen han sido realizadas sobre ejemplares machos de Gallus domésticus, raza Leghorn Blanca (denom comercial: Shaver Star Cross-288), cedidos por la entidad Avigrana S. A. La determinación del sexo inmediatamente después de la eclosión corrió a cargo del personal especializado de la citada industria.

El estudio cubre las edades comprendidas entre 0 y 16 días.

3.1.2. - Acondicionamiento de los animales

Los animales fueron adquiridos el mismo día de su nacimiento. Desde entonces y hasta el momento del sacrificio eran acondicionados en una estancia aislada térmica y acústicamente en cuyo interior se había dispuesto una batería de jaulas de 1 m² de superficie base dotadas con bebederos de relleno automático y con un amplio acceso al alimento.

La habitación, carente de ventanas, se iluminaba mediante 8 tubos fluorescentes de 20 wátios cada uno (philips TL 20w/55) dispuestos lateralmente. Los animales eran sometidos a un ciclo diurno artificial de 12 horas de luz y 12 de oscuridad controlado mediante un temporizador electrónico. Para mayor comodidad, este ciclo diurno artificial se hizo coincidir aproximadamente con el natural corrigiéndose según el horario oficial a lo largo del año. La estancia se mantuvo termostaticada entre 28° y 31°.

La climatización artificial se completaba con un extractor de turbina que renovaba el aire de modo continuo.

En tanto no se indique lo contrario, los animales fueron alimentados "ad libitum" con una dieta estándar para Pollitos Arranque (Sanders A-00). Desde el primer día los pollos eran estimulados a comer y beber y, en lo sucesivo, cuidados por las mismas personas. Los animales visiblemente enfermos o con conductas anormales eran retirados inmediatamente de las jaulas.

3.1.3.- Instrumentación

Centrifugación. - Para centrifugaciones a bajas revoluciones y que no requieran control expreso de temperaturas se han venido utilizando aparatos Piccolo (Martin Christ).

Durante las fases preparativas de suspensiones microsoma-les se utilizó una centrifuga refrigerada, de alta velocidad, Beckman J-21B y posteriormente una ultracentrífuga preparativa Beckman L3-50.

La sedimentación de proteínas requerida durante el ensayo enzimático se realizó en una micrófuga tipo B, también Beckman.

Las centrifugaciones necesarias durante la extracción de colesterol y colorimetrías de fosfolípidos se hicieron en un aparato refrigerado MSE, modelo Mistral-6L.

Espectrometría. - Las determinaciones isotópicas de ^{14}C y ^3H se llevaron a cabo en un equipo de centelleo líquido Philips Mod. PW 4510. Las deter-

minaciones de proteínas, colesterol y fosfolípidos se realizaron en un aparato Spectronic-20 de la Bausch & Lomb.

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

Las incorporaciones de acetato se llevaron a cabo en incubadores Gallenkamp IH-350, dotados de sistemas de agitación.

En la determinación de fosfolípidos, las digestiones se realizaron en un baño de arena de la firma Investar.

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

Aparatos de medida auxiliar. - Las pesadas del material biológico y los reactivos para la preparación de tampones, dietas etc, se hicieron en una balanza Sartorius Pmax = 160 g d = 0.1 g. Los restantes reactivos se pesaron en una balanza Mettler H20T Pmax = 160 g d = 0.01 mg.

Para la adición de sustratos y coenzimas a los tubos de reacción, colocación de muestras durante la cromatografía en capa fina y otras manipulaciones que requirieran medir pequeños volúmenes con gran precisión se han utilizado micropipetas "Emil Works" de enrasado automático por estrangulamiento (autocero High precisión).

Las determinaciones de pH se han llevado a cabo con un aparato Beckman expandomatic SS-2.

Varios. - Los lípidos insaponificables disueltos en éter de petróleo se llevaron a sequedad en un Rotavapor "R" de la firma Buchi (Suiza).

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

Los tejidos se homogeneizaron en un aparato tipo "Potter", mecánico, de la firma MSE, con pistilo de vidrio sin esmerilar.

Para la reacción enzimática se usaron tubos de polietileno Beckman de 400 μ l, desechables y con cierre hermético.

Se emplearon también agitadores S/Invester y vibradores Whirlimixer y Heidolph.

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

3.1.4. - Reactivos

Productos radiactivos. - Todos los compuestos radiactivos que han sido utilizados fueron suministrados por Radiochemical Centre, Amersham.

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

La incorporación de acetato se llevó a cabo con 1- 14 C

-acetato sódico, utilizándose $7(n) - ^3\text{H}$ colesterol como estandar interno.

Otros reactivos. - Se han utilizado HMG-CoA (no marcado), G6P, EDTA y DTT procedentes de la casa Sigma y G6PDH (grado I) y NADP^+ de la casa Boehringer-Mannheim GmbH (BmG). En tanto no se indique lo contrario los restantes reactivos utilizados procedían de las casas E. Merck. Darmstadt y Carlo Erba.

3. 2. - METODOS

Metodológicamente, las experiencias que componen el presente trabajo persiguen los siguientes objetivos fundamentales:

1. - Determinación de la actividad HMG-CoA - reductasa en la fracción microsomal de diferentes tejidos, "in vitro".
2. - Medida de las velocidades de incorporación de acetato radiactivo a residuo insaponificable en cortes finos de los citados tejidos.
3. - Determinación de colesterol total, libre y esterificado en membranas microsomales.
4. - Determinación, igualmente en membranas microsomales, de fosfolípidos totales y de los cuatro presentes mayoritariamente, por separado (esfingomielinas, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilinositoles).

A continuación se describen detalladamente las técnicas utilizadas para tales fines.

3. 2. 1. - Determinación de la actividad HMG-CoA - reductasa

De los diversos métodos descritos en la bibliografía (172, 173) los que gozan de mayor prestigio son los radiactivos.

Dentro de ellos uno de los más extendidos en la actualidad es el desarrollado por Shapiro y Rodwell (174). En el presente trabajo las determinaciones de actividad HMG-CoA - reductasa se han llevado a cabo por el citado método salvo ligeras modificaciones, tal como se describe a continuación.

3. 2. 1. 1. - Fundamento del método radiactivo.

En este tipo de técnicas se mide la incorporación de radiactividad del sustrato marcado con ^{14}C (^{14}C -HMG-CoA) en mevalonato, producto de la reacción. Generalmente se incluye un estándar interno de ^3H -mevalonato para permitir la corrección por pérdidas, durante el aislamiento ulterior del producto formado.

Puesto que se requiere un aporte considerable de coenzima reducido (2 moléculas de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ por molécula de sustrato transformado), frecuentemente se recurre a un sistema enzimático acoplado que regenere los equivalentes de reducción gastados a un ritmo adecuado. En la técnica utilizada, este sistema regenerante 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, de polaridad sensiblemente menor a la del sustrato

(HMG-CoA) y sus hidrolizados, de los que puede ser entonces separada por una técnica cromatográfica. Posteriormente, las δ -³H - mevalonolactona y δ -¹⁴C mevalonolactona pueden ser detectadas cuantitativamente y por separado, mediante espectroscopía de centelleo líquido.

3. 2. 1. 2. - Técnica

Que la HMG-CoA-reductasa es una enzima ligada a membranas microsomales es un hecho ampliamente apoyado por la evidencia experimental de que se dispone (159). Por consiguiente, y como paso previo al plateamiento de la reacción es necesario separar la fracción microsomal de los tejidos a ensayar, cosa que puede hacerse mediante un esquema adecuado de centrifugación diferencial. Una vez obtenida la suspensión, puede llevarse a cabo la reacción enzimática. Posteriormente, las actividades enzimáticas se evalúan de modo cuantitativo. Veamos por separado cada una de estas tres etapas.

3. 2. 1. 2. 1. - Aislamiento de microsomas

Se ha seguido el procedimiento descrito por Dugan y col. (169) con ligeras modificaciones procediéndose de la siguiente manera:

- 1.- Los animales se sacrifican por decapitación a la hora adecuada, extrayéndoseles rápidamente el órgano u órganos problema. Caso de tratarse del hígado se han de tomar precauciones para no arrastrar consigo ni romper la vesícula biliar. En el caso del tubo digestivo se tomó fundamentalmente el asa duodenal.

2. - Una vez secos y pesados, los fragmentos de tejido se resuspenden en un tampón fosfato potásico 50 mM pH = 7,4 que es además, 30 mM en EDTA, 250 mM en ClNa y 1.0 mM en DTT* en proporciones peso-tejido/vol. - tampon : 1/3. El compuesto se mantiene en baño agua-hielo.
3. - A continuación se homogeneiza en un Potter mecánico, utilizando pistilos de vidrio sin esmerilar. Desde el comienzo de esta operación, y en lo sucesivo, es fundamental que el recipiente que contiene la muestra permanezca sumergido en un baño agua-hielo para evitar que las modificaciones térmicas ambientales introduzcan variaciones no controladas de actividad.
4. - Los homogenados se someten a una primera centrifugación de 5000 x g. durante 15 min. a 4°C, de la que se desecha el sedimento, recuperándose el sobrenadante. Este primer paso tiene por objeto desprenderse de los restos celulares groseros, fragmentos sin triturar, etc.
5. - Los sobrenadantes procedentes de la etapa anterior se someten a una nueva centrifugación (15000 x g; durante 15 min, a 4°C), durante la cual sedimentan mitocondrias, lisosomas y partículas relacionadas.

* Dado que el EDTA basifica considerablemente el medio, para realizar el tampón disolver previamente el EDTA, ClNa y DTT en un volumen adecuado de KH_2PO_4 50 mM hasta conseguir un pH = 7,4 y enrasar luego con tampón fosfato potásico 50 mM pH = 7.4 hasta el volumen necesario para obtener las concentraciones adecuadas de cada uno de los tres componentes.

6. - Finalmente, los sobrenadantes de 15000 x g se centrifugan a 105000 x g durante 60 min (4°C), sedimentando la denominada fracción microsomal integrada fundamentalmente por ribosomas y fragmentos de retículo endoplasmático liso y rugoso y aparato de Golgi.

7. - Una vez desechado el sobrenadante, este último sedimento es removido y resuspendido en un volumen apropiado (generalmente 1 ml) del mismo tampón utilizado durante la extracción.

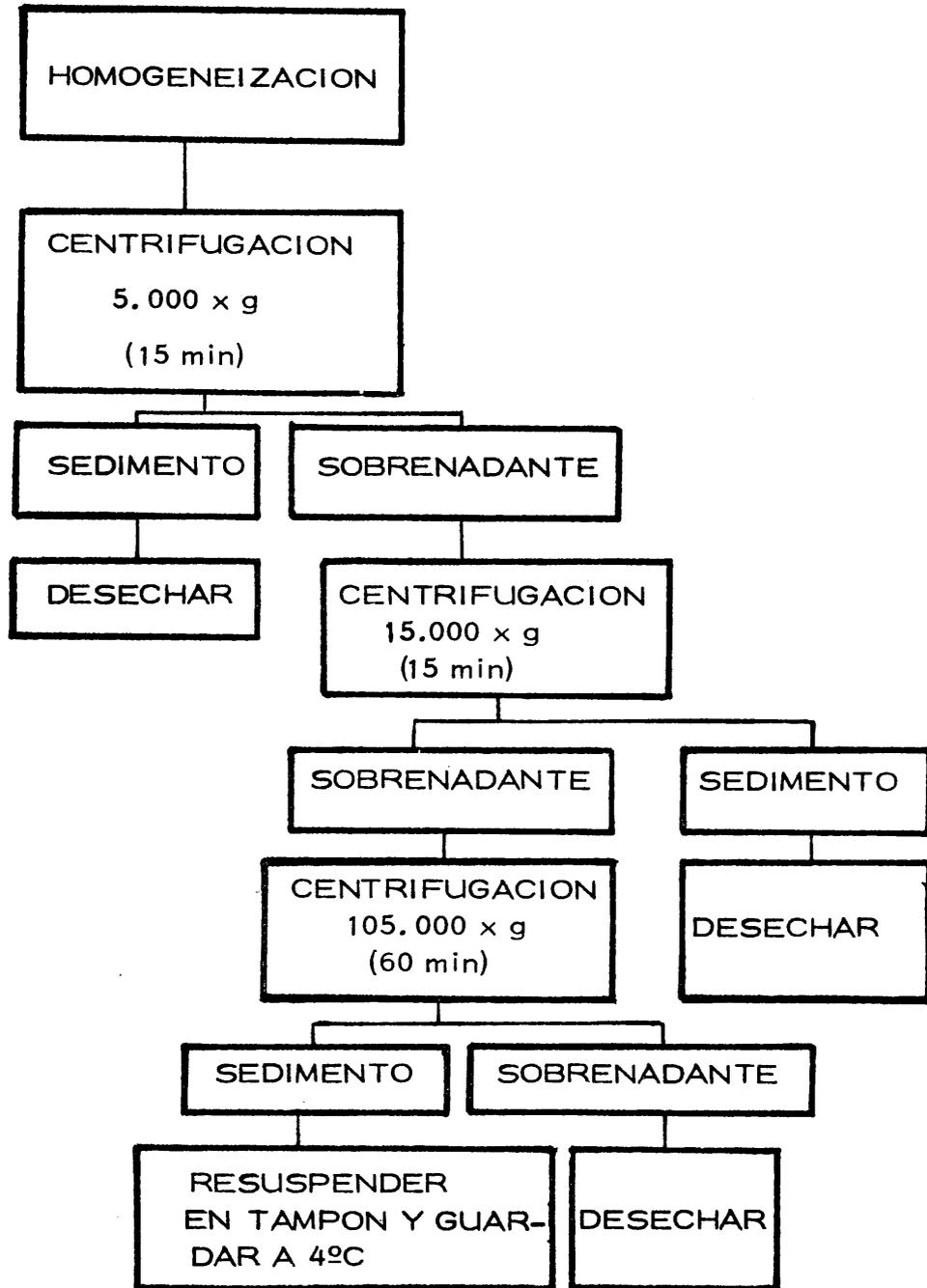
8. - Las suspensiones microsomales así obtenidas se conservan a 4°C hasta el momento de la reacción (Esquema 1)

9. - La concentración proteica de las suspensiones microsomales se determinó mediante el método de Lowry y col. (175) basado en la asociación de las reacciones de Biuret (reacción de enlaces peptídicos) y de Folin (reactivo de la tirosina).

3. 2. 1. 2. 2. - Reacción enzimática

La reproducción "in vitro" de la reacción catalizada por la HMG-CoA -reductasa requiere que se adicionen a los extractos cantidades convenientes de sustrato y coenzima (o mejor aún, sistema regenerante - ver apdo. 3. 2. 1. 1.). En el presente trabajo, la mezcla de reacción contiene, para un volumen final de 150 μ l.

- a. - 100 μ l de suspensión de microsomas previamente diluida en tampón de extracción hasta 2 a 4 mg/ml de proteínas
- b. - 25 μ l de una mezcla (sistema regenerante) que en ese volumen contiene 4.5 μ moles de G6P; 0.3 U.I. de G6P-DH y 450 nmoles de NADP.⁺ (Se trata del mismo tampón



Esquema 4

de extracción al que se han añadido los citados componentes de tal modo que sea 18 mM en NADP,⁺ 180 mM en G6P y con 12000 V.I. de G6PDH por litro). La mezcla se preparaba extemporaneamente.

- c. - 25 μ l de una disolución de HMG-CoA y ¹⁴C -HMG-CoA en las proporciones adecuadas para que el citado volumen contuviese 50 nmoles de sustrato de radiactividad específica comprendida entre 2000 y 5500 dpm/nmol. Como disolvente se utilizó tampón fosfato potásico 50 mM, pH = 5.8 (La disolución se conservaba congelada a -20°C).

A menos que se indique lo contrario, el procedimiento seguido es el siguiente:

- 1.- Los 100 μ l de suspensión microsomal se introducen en tubos desechables de polietileno de 400 μ l de capacidad (tipo Beckman-B); provistos de tampón, y se preincuban a 37°C durante 5 min.
- 2.- La reacción se inicia por adición de sustrato marcado (25 μ l) y del sistema regenerante (25 μ l), en este orden. Una vez cerrados los tubos, se agitan suavemente y se incuban a 37°C durante 30 min.
- 3.- Transcurrido este tiempo la reacción se detiene con 25 μ l de ClH 10N que a su vez acidifica el medio induciendo la lactonización del mevalonato formado.
- 4.- Asimismo, al terminar la reacción, se añaden 25 μ l de una solución tamponada de mevalonolactona y ³H -mevalonolactona tal que el volumen citado (25 μ l) contenga 0.78 mg de lactona y entre 40000 y 160000 dpm.

y que constituye el estándar interno mediante el que pueden cuantificarse las pérdidas acumuladas durante la manipulación posterior. Por otra parte actuará de portador facilitando el desarrollo en capa fina de las pequeñas cantidades de ^{14}C - mevalonolactona procedentes de la reacción enzimática. La mevalonolactona y la ^3H -mevalonolactona se conservan en soluciones bencénicas o toluénicas a -20°C . Para su utilización, se evaporan extemporaneamente en corriente de N_2 y se resuspenden en tampón de extracción.

5. - Una vez detenida la reacción, la mezcla (cuyo volumen es ahora de $200\ \mu\text{l}$) se mantiene otros 30 min a 37°C para facilitar la completa lactonización del mevalonato formado enzimáticamente.

6. - Seguidamente los tubos se centrifugan durante 1 min a $10.000 \times g$ (microfuga Beckman-B), con el fin de sedimentar las proteínas y se conservan refrigerados hasta el momento de la cromatografía en capa fina.

3. 2. 1. 2. 3. - Aislamiento y medida del producto de reacción

La MVA lactona puede ser fácilmente separada del HMG-CoA y de sus productos de hidrólisis mediante cromatografía en capa fina. Para ello se ha procedido de la siguiente manera.

1. - Sobre un extensor Shandon Unoplan se colocan placas de vidrio de $5 \times 20\ \text{cm}$ y se desengrasa con acetona.

Por otra parte, 50 g de Silicagel G (tipo 60; Merck) se llevan a 100 ml con agua destilada. La suspensión se agita vigorosamente durante 1.5 min. El contenido se vierte entonces sobre el dispositivo distribuidor (ajustado para un espesor aproximado de 0,4 mm) y se extiende

uniformemente sobre las placas.

El silicagel se deja secar completamente al aire y se activa luego a 110°C durante 60 min como mínimo.

Una vez activadas de esta forma, las placas se guardan en campana de desecación hasta el momento de utilizarlas.

2.- Sobre las placas activadas, y a unos 2 cm del borde, se aplican 100 μ l de cada uno de los sobrenadantes con ayuda de micropipetas, secando con calor suave.

Inmediatamente después se desarrollan en un sistema benceño: acetona (1:1). Previamente las campanas, rodeadas internamente con papel de filtro, se han mantenido cerradas durante al menos 60 min, para conseguir una saturación completa.

El recorrido del frente se prefijó en unos 17 cm.

3.- El revelado puede hacerse con vapores de yodo. No obstante, las placas destinadas a centelleo líquido no se revelan habitualmente, puesto que la eficacia de contaje desciende considerablemente, aún después de sublimado el yodo.

Por el contrario y durante la puesta a punto de la técnica pudo comprobarse que la mayor parte de la MVA-lactona se encuentra en la zona de Rf comprendida entre 0.38 y 0.70. Esta zona era raspada sistemáticamente (sin necesidad de revelar) y depositada en los viales de centelleo.

4.- Sobre ellos se añade 10 ml de líquido de centelleo, agitando vigorosamente durante 15 seg y se guardan refrigerados y protegidos de la luz hasta el momento de contaje.

El líquido de centelleo utilizado se prepara disolviendo 7 g de PPO; 0.3 g de dimetil-POPOP y 100 g de naftaleno en un litro dioxano, dejando reposar durante varias horas y agitando después hasta la disolución total. (se conserva en frasco color topacio. Su duración no debe sobrepasar las 2-3 semanas).

5.- Además del conjunto de viales problema, cada experiencia constaba de dos viales con 25 µl de la solución de ³H-MVA lactona que se añadían al detener la reacción.

A cada vial se adiciona una cantidad de ¹⁴C -MVA con radioactividad de 3 a 6 veces menor. Este vial, que se hace cada vez duplicado, constituye el patrón de tritio.

6.- Cálculos : La actividad específica del enzima se calcula en cada caso a partir de la expresión siguiente:

$$Ae = \frac{DPM \text{ } ^3\text{H } p \times DPM \text{ } ^{14}\text{C } m}{DPM \text{ } ^3\text{H } m \times Re \times P \times T}$$

donde es:

Ae = Actividad específica de la HMG-CoA -reductasa expresada en pmoles x min⁻¹ x mg Proteína⁻¹.

DPM ³H p = densitegraciones por min de ³H contenido en el patrón

DPM ³H m = desintegraciones por min del ³H contenido en la muestra

DPM ¹⁴C m = desintegraciones por min del ¹⁴C contenido en la muestra

Re = Radiactividad específica del HMG-CoA en DPM / nmol

P = mg de proteínas presentes en la muestra

T = tiempo de incubación en min.

Las suspensiones microsomales procedían de fragmentos mezclados de tejido de cinco animales diferentes.

Los resultados se expresan como valores medios de 2 a 3 experiencias en cada una de las cuales se hicieron cuatro determinaciones como mínimo, y se acompañan del error estándar de la media.

3. 2. 2- Incorporación de acetato a lípidos insaponificables

3. 2. 2. 1. - Fundamento

Uno de los procedimientos clásicos utilizados para evaluar la ruta biosintética de colesterol a partir de acetato consiste en incubar $1-^{14}\text{C}$ -acetato ó $2-^{14}\text{C}$ -acetato con preparaciones adecuadas y medir luego la velocidad de incorporación de radiactividad a lípidos insaponificables constituidos principalmente por colesterol y otros esteroides, hidrocarburos y alcoholes de cadena larga.

Para llevar a cabo este tipo de incorporaciones puede inyectarse el acetato marcado al animal vivo, intraperitonealmente. Puede, por el contrario, incubarse con cortes finos de tejido en un medio fisiológico adecuado. Asimismo, el sustrato radiactivo puede adicionarse a homogenados de órganos junto con los cofactores necesarios para cada etapa.

De todos estos procedimientos se ha preferido utilizar cortes finos de tejido por cuanto que respetándose aún la compartimentación celular, no presenta los inconvenientes asociados a trabajar con animales intactos (estres, dilución excesiva del marcador, interacciones entre órganos, etc).

3. 2. 2. 2. - Técnica.

La técnica seguida puede considerarse integrada por las siguientes etapas secuenciales:

- obtención e incubación de los cortes de tejido
- extracción de lípidos insaponificables.
- detección y medida de los productos de reacción

A continuación y por separado se describen, cada una de ellas.

3. 2. 2. 2. 1. - Obtención e incubación de los cortes de tejido

1. - Una vez sacrificados los animales por decapitación, se procede con toda rapidez a la extracción de los órganos y a su colocación en un medio tamponado y refrigerado a 4°C. Una vez limpios, en el caso del hígado, se hicieron cortes de unos 0.2 mm de espesor aproximadamente, con ayuda de un microtomo manual. Cuando se trataba del tubo digestivo se incubaban fragmentos intactos del asa duodenal, por considerar que la mayor parte de la actividad procede de la delgada mucosa que recubre la luz del tubo.

2. - El tampón utilizado es un medio de Krebs-Ringer bicarbonato pH = 7.4 de composición: 0.154 M en cloruro sódico, 0.154 M en cloruro potásico 0.154 M en fosfato monopotásico, 0.154 M en sulfato magnésico, 0.11 M en cloruro potásico, 0.154 M en fosfato monopotásico, 0.154 en sulfato magnésico, 0.11 M en cloruro cálcico y 0.154 M en Bicarbonato sódico. La mezcla se realiza extemporaneamente a partir de soluciones madres de cada una de las sales según el siguiente protocolo:

- 100 ml de una solución de ClNa de 0.9 g/100 ml
- 4 ml de una solución de ClK de 1.15 g/ 100 ml
- 1 ml de una solución de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ de 2.11g/ 100 ml
- 1 ml de una solución de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 3.82 g/100 ml
- 3 ml de una solución de Cl_2Ca de 1.22g /100 ml
- 21 ml de una solución de CO_3HNa de 1.30 g / 100 ml

Para estas proporciones, el pH que se obtiene es el indicado (pH = 7.4).

3. - En tanto no se indique lo contrario, la incubación se llevó a cabo en matraces tipo Warburg (con tubuladura lateral) de 25 ml de capacidad, cada uno de los cuales contenía lo siguiente:

- 3 ml de tampón Krebs-Ringer bicarbonato
- un peso adecuado de cortes de tejido (entre 50 y 200 mg) procedentes de 5 pollos diferentes.

- 2.5 μCi de ($1\text{-}^{14}\text{C}$) acetato procedentes de una solución acuosa de 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ y 0.87 $\mu\text{moles}/\text{ml}$, que habitualmente se conserva a -20°C .

4. - Los componentes se adicionan en el orden indicado tras lo cual los matraces se alojan en un incubador metabólico termostatzado a 37°C y provisto de un movimiento de vaiven ajustado a 65 r.p.m. Durante el transcurso de la incubación (generalmente de 1 a 2 horas) los matraces se gasean contínuamente con una mezcla de carbógeno (95% de Oxígeno y 5% de anhídrido carbónico).

5. - La incorporación se detiene por adición de 20 ml de potasa etanólica preparada extemporaneamente a partir de 1.25 ml de una solución de KOH al 90 % y 20 ml de etanol al 70%. Asimismo, a cada matraz se añadió una cantidad conocida de ^3H -colesterol equivalente en d.p.m a unas 3 a 6 veces las d.p.m. esperadas de ^{14}C , con objeto de cuantificar las pérdidas acumuladas durante la extracción posterior. Constituye, pues el estandar interno.

3.2.2.2.2. - Extracción de lípidos insaponificables

1. - La saponificación puede llevarse a cabo calentando la mezcla contenida en cada matraz a unos 70°C, en reflujo y durante 4 horas, o bién dejando actuar la potasa alcohólica durante, al menos, 12 horas a temperatura ambiente.

En general, se utilizó este último procedimiento.

2. - Posteriormente se realizan tres extracciones consecutivas con 25 ml de eter de petroleo cada vez. Las fases orgánicas, que contienen los lípidos insaponificables, se reúnen y se lavan tres veces con agua destilada, tras lo cual se dejan reposar 30 min, como mínimo, con unos 15 g de sul-

fato sódico anhidro para conseguir una deshidratación total.

3. - La sal se elimina luego mediante filtración en placa porosa, recogiendo la fase orgánica en un matraz esférico de boca esmerilada.

El contenido del matraz se lleva a sequedad en rotavapor redi solviéndose el residuo seco en un volumen considerablemente menor de éter etílico (6 a 8 ml) y se tranfiere a un vial. Este nuevo disolvente se evapora con calor suave, añadiéndose 1 ml de cloroformo del que se toman 2 alcuotas en sendos viales de centelleo.

Estas alcuotas son evaporadas de nuevo sobre una superficie seca a 60°C y sobre el residuo se adicionnan finalmente 10 ml de líquido de centelleo.

3. 2. 2. 2. 3. - Detección y medida de los productos de reacción

1. - La determinación de radiactividad debida a ^{14}C y a ^3H , presente en los viales, se lleva a cabo, como en el caso de la HMG-CoA-reductasa, mediante espectroscopía de centelleo líquido.

2. - El líquido de centelleo, en este caso, consiste en una disolución de 2g/l de PPO y 0.02 g/l de POPOP en una mezcla de tolueno: metanol 1:1 (v:v).

Su duración es de 2 a 3 semanas y se conserva a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Una vez añadido a los viales se agitan enérgicamente durante 10-15 segundos y se guardan refrigerados y en oscuridad hasta su contaje.

3. - Además de los viales problema, cada experiencia consta de un vial duplicado que contiene igual cantidad de ^3H -colesterol que el añadido a las muestras, y que constituye el patrón de ^3H .

4. - Cálculos. - La velocidad de incorporación de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$V = \frac{\text{DPM } ^{14}\text{C}_m \times \text{DPM } ^3\text{H}_p}{\text{DPM } ^3\text{H}_m \times \text{Re} \times T \times M \times V}$$

donde es:

V = μ moles de acetato incorporado, por hora y por gramo de tejido.

$\text{DPM } ^{14}\text{C}_m$ = desintegraciones por minuto debidos al ^{14}C contenido en la muestra.

$\text{DPM } ^3\text{H}_m$ = desintegraciones por minuto debidas al ^3H contenido en la muestra

$\text{DPM } ^3\text{H}_p$ = desintegraciones por minuto debidas al ^3H contenido en el patrón de ^3H .

Re = Radiactividad específica del $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato en DPM/μ moles.

T = tiempo de incubación en horas

M = Peso de tejido por muestra en gramos

V = fracción de la solución clorofórmica final destinada a centelleo (ml).

Los fragmentos de tejido de cada incubación eran mezcla de cinco animales. Los resultados se expresan como media aritmética de, al menos, cuatro determinaciones \pm el error estandar de la media.

3.2.3. - Determinación de colesterol microsomal

3.2.3.1. - Fundamento

El método seguido, descrito por Carr (176) y Martenson (177), es una modificación de la clásica reacción de Lieberman-Burchard en que el colesterol y otros compuestos estructuralmente muy relacionados, tras sufrir deshidrataciones, condensaciones e isomerizaciones originan finalmente especies coloreadas con máximos de absorción hacia los 625 nm. que pueden evaluarse, cuantitativamente, en un espectrofotómetro frente a una curva patrón.

Como es sabido, el colesterol puede encontrarse libre o esterificado. Ambas formas pueden separarse mediante cromatografía en capa fina, en un sistema adecuado, y determinarse luego por separado. Tal es el procedimiento seguido en el presente trabajo.

3.2.3.2. - Técnica

Las determinaciones se han llevado a cabo sobre suspensiones microsomales obtenidas del modo descrito en el apartado 3.2.1.2.1.

Un requerimiento previo al análisis cuantitativo de colesterol es extraer los lípidos totales de la suspensión. Del extracto lipídico puede por una parte, analizarse el total, y por la otra, y tras separación cromatográfica, el libre y esterificado.

Cada una de estas etapas se describe a continuación.

3.2.3.2.1. - Extracción de lípidos

Para extraer los lípidos totales se ha seguido la técnica de Santiago y col. (178).

1. - Alícuotas de la suspensión microsomal con 1-2 mg/ml de proteínas son tratados con volúmenes iguales de ácido perclórico 0.6 N, agitándose y centrifugándose a 1.000 x g durante 15 min y baja temperatura (0°-4°C). De este modo sedimentan lípidos y proteínas.

2. - Una vez desechado el sobrenadante, los lípidos del sedimento se extraen por adición de 1ml de una mezcla cloroformo:metanol:ácido clorhídrico (200: 100 :1), removiendo la suspensión sucesivas veces durante 30 min. A continuación se adicionan 3 ml de ClH 0.1 N y se centrifugan a 1.000 x g durante 25 min.

3. - En el centrifugado pueden distinguirse tres fases:

- una superior, acuosa
- otra inferior, orgánica
- una película que ocupa la interfase y que está constituida por proteínas desnaturalizadas y precipitadas.

De ellas, la fase acuosa se elimina succionando con una pipeta Pasteur provista de una perilla de goma. En cuanto a la fase clorofórmica se separa de la película proteica por decantación cuidadosa a un segundo tubo de boca esmerilada.

Las proteínas, que quedan adheridas a las paredes del tubo de centrífuga tras la decantación de la fase clorofórmica, son sometidas a una nueva extracción con la mezcla cloroformo: metanol: ácido clorhídrico

4. - Ambas fases clorofórmicas reunidas se evaporan bajo corriente de nitrógeno. Seguidamente, los lípidos totales se redisuelven en un volumen adecuado de cloroformo.

3. 2. 3. 2. 2. - Determinación de colesterol total

1. - Para proceder a la determinación colorimétrica de colesterol se necesita preparar una curva patrón. Esto se hizo a partir de una solución clorofórmica de colesterol de 1 mg / ml. Alícuotas de 25, 50 y 100 μ l de esta solución, así como volúmenes adecuados (en general, 100 μ l) de los extractos lipídicos obtenidos según el apartado anterior son llevados a sequedad en corriente de nitrógeno y resuspendidos después en 100 ml de cloroformo, agitando suavemente y verificando su total disolución.

2. - A cada uno de los tubos se adicionan seguidamente 3 ml de una mezcla anhídrido acético: ácido sulfúrico (10:1) preparado extemporaneamente por adición lenta del ácido sobre el anhídrido enfriado a 4°C. (es necesario que la mezcla esté exenta de color).

3. - Los tubos se agitan, y se disponen en un baño a 25°C donde permanecen de 10 a 15 min. antes de ser medidos en un espectrofotómetro a 625 nm. frente a un blanco de cloroformo tratado de igual manera.

4. - Cálculos. - La concentración de colesterol total se ha estimado según:

$$C_t = \frac{DO_t \times a \times V_l}{V_t \times P \times V_i}$$

donde:

C_t = μ gr de colesterol por mg de proteína

DO_t = absorbancia debida al colesterol total

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

V_l = Volumen de extracto lipídico obtenido en ml

V_t = Volumen de la alícuota de extracto lipídico utilizado para la colorimetría (ml)

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

P = Concentración de proteínas de la suspensión microsomal en mg/ml.

3. 2. 3. 2. 3. - Determinación de colesterol libre y esterificado

1. - La separación del colesterol libre de sus ésteres se llevó a cabo mediante cromatografía de lípidos neutros en capa fina de silicagel G (tipo 60, Merck), en un sistema cloroformo: benceno (3:2), según la técnica de Corominas y col (179).

Se utilizaron para ello placas de vidrio de 20 x 20, preparadas y activadas según se describe en el apartado 3. 2. 1. 2. 3. colocándose 100 μ l de cada muestra a unos 2 cm del borde e introduciéndose, una vez

secas, en una campana saturada de líquido de desarrollo desde unas cuatro horas antes. El recorrido se prefijó en unos 17 cm.

2. - El revelado se realizó con vapores de yodo. El yodo se adsorbe reversiblemente sobre las manchas de compuestos insaturados, dándoles coloración parda.

Mediante esta técnica se visualizan claramente los siguientes grupos de lípidos:

Fosfolípidos ($R_f = 0.00$)

Ácidos grasos libres ($R_f = 0.05$)

Colesterol libre ($R_f = 0.11$)

Triglicéridos ($R_f = 0.50$)

Esteres de colesterol ($R_f = 0.67$)

3. - Las manchas correspondientes al colesterol libre y esterificado fueron marcadas con un punzón y, después de sublimarse de nuevo el yodo por introducción de las placas en una estufa a 110°C , se rasparon, depositándose en sendos tubos de ensayo.

Acto seguido se extraen ambos del silicagel, agitando energicamente con 3 ml de una mezcla etanol: acetona: éter, en proporciones (1: 1: 1) y centrifugando durante 15 min a $1:000 \times g$. La extracción se repite dos veces.

Los sobrenadantes, una vez reunidos, se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Luego se resuspenden en cloroformo y se determinan siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 3. 2. 3. 2. 2.)

4. - Cálculos. - Las concentraciones microsomaes de colesterol libre y esterificado, así como sus porcentajes relativos, se han calculado a partir de:

$$C_L = \frac{DO_L \times a \times V_L}{V_P \times P \times V_i} \qquad C_E = \frac{DO_E \times a \times V_L}{V_P \times P \times V_i}$$
$$\% C_L = \frac{C_L \times 100}{C_L + C_E} \qquad \% C_E = \frac{C_E \times 100}{C_L + C_E}$$

donde es:

C_L = μg de colesterol libre por mg de proteínas microsomaes

C_E = μg de colesterol esterificado por mg de proteínas microsomaes.

$\% C_L$ = porcentaje de colesterol libre

$\% C_E$ = porcentaje de colesterol esterificado

DO_L = absorbancia debida al colesterol libre

DO_E = absorbancia debida al 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 de extracto lípidico obtenido (ml).

V_P = Volumen de extracto lípidico cromatografiado (ml)

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

P = Concentración de proteínas de la suspensión microsomal en mg/ml.

Los extractos lipídicos se han obtenido por mezcla de tejidos de cinco pollos. Las desviaciones encontradas sobre los valores medios fueron inferiores, en todos los casos, al 5 %

3.2.4. - Determinación de fosfolípidos microsomales

3.2.4.1. - Fundamento

Por lo general, este tipo de técnicas consisten en efectuar primeramente una fosforilisis ácida y determinar luego fosfatos mediante una reacción coloreada, cuantitativa, con ácido molíbdico. El ácido molíbdico pasa a fosfomolíbdico el cual se reduce selectivamente en presencia de ácido 1-amino-2-naftol-3-sulfónico dando un compuesto de color azul intenso con un máximo de absorción a 830 nm.

3.2.4.2. - Técnica

En el presente trabajo se ha seguido el método de Fiske y Subbarow (180), modificado por Bartlett (181), partiéndose de los extractos obtenidos según se describió en el apartado 3.2.3.2.1.

La separación de los fosfolípidos mayoritarios se llevó a cabo por cromatografía en capa fina según la técnica descrita por Vitiello y Zanetta (182).

3. 2. 4. 2. 1. - Determinación de fosfolípidos totales

1. - Para poder extrapolar las concentraciones a partir de las densidades ópticas de las muestras, se utiliza una solución patrón de fosfato disódico equivalente a 10 γ / ml de fósforo.

2. - En sendos tubos graduados de 10 ml lavados con detergente especial exento de fosfatos, se añaden alícuotas de extracto lipídico del orden de 25 - 50 μ l, y asimismo volúmenes de 0.15; 0.3 y 0.6 ml de la solución patrón.

A todos estos tubos se adiciona 1.2 ml de ácido perclórico al 70 % y dos gotas de molíbdato amónico al 5 %, completándose con agua bidestilada hasta 2 ml. Se agitan manualmente con suavidad y se colocan en un baño de arena tapados con bolas de cristal.

3. - La digestión se lleva a cabo dejando subir la temperatura hasta 180°C donde se mantienen unos 30 min hasta que el color haya desaparecido completamente.

Se dejan entonces enfriar lentamente y se añaden 0.4 ml de molibdato amónico al 5 % en sulfúrico 2 M y 0.4 ml de reactivo de Fiske y Subbarow (2 g / l de 1-amino-2-naftol-3-sulfónico; 120 g / l de metabisulfito sódico y 12 g de sufito sódico anhidro disueltos en agua bidestilada. Calentar 1 min al baño maría para su perfecta disolución). Finalmente se completan hasta 10 ml de agua bidestilada, se agitan y se colocan en un baño maría a 100°C durante 15 min apareciendo coloración azul. Una vez fríos, se leen a 830 nm frente a un blanco de agua bidestilada tratada de igual forma.

4.- Cálculos.- La concentración de fósforo lipídico se calcula por la siguiente fórmula:

$$P_T = \frac{DO_P \times a \times V_L}{V_P \times V_i \times P}$$

en que:

P_T = Concentración de fósforo lipídico total en μgr por mg de proteínas microsomales

DO_P = Absorbancia debida al fósforo total

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

V_L = Volumen, en ml , de extracto lipídico obtenido inicialmente.

V_P = Volumen de extracto lipídico utilizado para la colorimetría en ml .

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

P = Concentración de proteínas de la suspensión microsomal en $\mu\text{g} / \text{ml}$.

3.2.4.2.1.- Determinación cuantitativa de fosfolípidos mayoritarios

1.- La separación de los cuatro grupos mayoritarios de fosfolípidos presentes en membranas microsomales de diversos tejidos de pollo, esfingomielinas, fosfatidilcolinas, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas, se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina utilizándose placas de vidrio de 20 x 20, extendidas y activadas según el apartado 3.2.1.2.3.

2. - 50 μ l de cada una de las muestras de extractos lipídicos se colocan a unos 2 cm del borde, y, una vez secos, se desarrollan en un sistema acetato de etilo: n-propanol: cloroformo: metanol: solución acuosa de cloruro potásico al 25 % en proporciones 25: 25: 25: 10: 9.

Las campanas cromatográficas han de saturarse del líquido de desarrollo durante, al menos 18 horas. El recorrido se prefijó en unos 17 cm.

3. - Acabado el proceso, las placas se secan con aire caliente y se revelan con iodo. Esta técnica permite distinguir claramente los siguientes grupos:

- Esfingomielinas (Rf = 0.07)
- Fosfatidilcolinas (Rf = 0.13)
- Fosfatidilinositoles (Rf = 0.21)
- Fosfatidiletanolaminas (Rf = 0.37)
- Sulfátidos (Rf = 0.55)
- Lípidos neutros (Rf = 0.87)

Las manchas correspondientes a los cuatros primeros se marcan y el iodo es eliminado entonces por calentamiento en estufa a 110 °C.

4. - Las zonas marcadas se raspan con cuchillas y se introducen en tubos graduados de 10 ml con objeto de llevar a cabo la digestión de ácido perclórico y la colorimetría de fósforo, según se describe en 3.2.4.2.1. La única precaución a tomar en cuenta es centrifugar los tubos antes de su lectura en espectrofotómetro para evitar la interferencia del silicagel

5.- Cálculos.- Las concentraciones de fósforo debida a cada uno de los fosfolípidos investigados, así como sus porcentajes relativos se han calculado por:

$$P(X) = \frac{D.O.(X) \times a \times V_L}{V_c \times V_i \times P}$$

$$\% P(X) = \frac{P(X) \times 100}{P(ESF) + P(PC) + P(PI) + P(PE)}$$

$P(X)$ = μg de fosforo por mg de proteínas microsomales debidas al fosfolípido X (donde X puede ser ESF; PC; PI ó PE).

$DO(X)$ = absorbancia debida al fósforo procedente de 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 obtenido inicialmente en ml

V_c = Volumen de extracto lipídico cromatografiado en ml

V_i = Alícuota de la suspensión microsomal de la que se parte expresada asimismo en ml.

P = Cocentración de proteínas de la suspensión microsomal en mg/ml

Para calcular la relación molar colesterol/fósforo se ha utilizado la expresión siguiente:

$$C/p = \frac{\mu\text{g C} / P_{mc}}{\mu\text{g P} / P_{at f}}$$

en que es:

$\mu\text{g C}$ = microgramos de colesterol por mg de proteína

$\mu\text{g P}$ = microgramos de fósforo por mg de proteína

Pm_c = Peso molecular del colesterol (388,66)

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

C/p = razón molar colesterol: fósforo.

Las suspensiones microsomales de partida procedían de tejidos mezclados de cinco animales. Las desviaciones de los valores frente a la media fueron siempre inferiores al 5 %

3.2.5. - Medida simultanea de radiactividad debida a ^3H y ^{14}C , presentes en la misa muestra, mediante espectrometría de centelleo líquido

Debido al fenómeno de autoabsorción que presentan los emisores de baja energía como ^3H y ^{14}C , para medir este tipo de isótopos hay que recurrir a la espectrometría de centelleo líquido, en que el disolvente de la muestra radiactiva posee componentes que, al entrar en colisión con una partícula β , captan su energía, excitándose, por promoción de un electrón a niveles superiores. A su caída emiten de nuevo la energía captada en forma de fotones luminosos. Estos, al incidir sobre el cátodo de un tubo fotomultiplicador, originan un impulso eléctrico detectable cuya altura es proporcional a la energía de la partícula.

En un emisor β , la energía puede tener cualquier valor comprendido entre 0 y un máximo $E_{\beta\text{max}}$ originándose, por tanto, impulsos de altura variable.

El equipo de detección utilizado (Philips PW 5410) va equipado con cuatro canales de medida, independientes, dotados cada uno de dos discriminadores (superior e inferior) que, colodados en forma apropiada, pueden seleccionar solo aquellos impulsos cuya alturas queden dentro de unos márgenes prefijados. Posee, además, dos canales externos adicionales (canales 5 y 6) que, en realidad consisten en un único canal provisto de tres discriminadores (superior, medio e inferior). Las lecturas que se hagan por cada canal corresponderán a partícula de energías comprendidas dentro de unos límites, impuestos precisamente por la posición de los discriminadores.

En un aparato ideal, el número de cuentas registradas coincidiría con el de desintegraciones habidas en el mismo intervalo de tiempo. En la realidad, muchas de ellas se pierden, de modo que este número es menor, (frecuentemente la energía de la emisión es absorbida por moléculas extrañas, presentes en el medio, e incapaces de excitarse. Es lo que se llama "quenching" o "extinción de la muestra".

El cociente entre las cuentas acumuladas en un minuto (cpm) y las desintegraciones por minuto (dpm) que posee la muestra define un parámetro característico del aparato y de las condiciones de medida, denominado "eficiencia de contaje" (E_f):

$$E_f = \text{cpm} / \text{dpm}$$

Obviamente, el objeto de una medida es calcular los dpm ó actividad absoluta que posee la muestra, ya que esta es una magnitud independiente del equipo utilizado. Ahora bien, el aparato hace sus lecturas en cpm, de aquí que sea imprescindible conocer la eficiencia. Esta eficien-

cia de contaje, sin embargo, no es constante, sino que varía con la extinción de la muestra. Para calcular, se recurre con frecuencia al método de la relación de canales externos (E. S. R.).

Este método aprovecha la interacción por efecto Compton de una fuente externa de rayos gamma (^{133}Ba) con el líquido centelleador del vial que está siendo medido.

Utilizando un patrón de baja extinción se ajustan los discriminadores de los canales 5 y 6 de tal forma que el área comprendida entre la curva y el eje de abscisas sea la misma en ambos canales (Figura 1). Ello se pone de manifiesto porque las cpm registradas en ambos canales son las mismas, con lo que la relación de canales externos (E. S. R.) vale la unidad.

Si una vez ajustados los discriminadores en su posición correcta se mide un vial con extinción, el área de la zona del espectro correspondiente al canal 5 se hace mayor que la del canal 6 por lo que la relación:

$$\text{E. S. R.} = \frac{\text{cpm canal 6}}{\text{cpm canal 5}}$$

Se hace menor que la unidad y tanto menor cuanto mayor sea la extinción del vial, (trazo punteado de la fig. 1).

Para llevar a cabo el calibrado se utiliza un juego de patrones que contienen igual actividad del radioisótopo a medir, y se diferencian unos de otros en el grado de extinción. De esta forma se calcula una función experimental que relaciona los valores de eficiencia con los de la

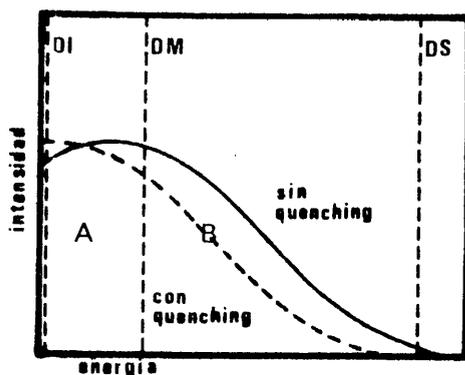


Fig. 1

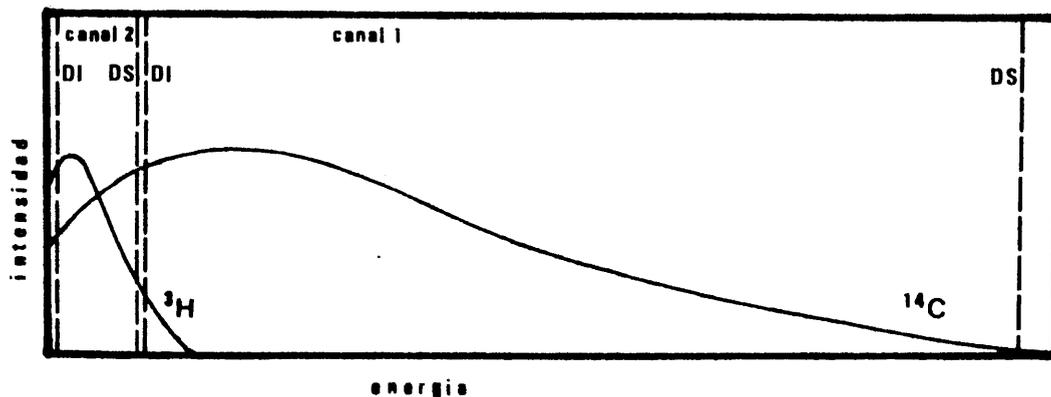


Fig. 2

Fig. 1. - Efecto de la extinción sobre el espectro de un emisor B. La línea continua representa el caso de una muestra con baja extinción. Cuando la extinción aumenta, el espectro se retrae según muestra la línea de puntos. D. I.; D. M. y D. S. representan, en el ejemplo, las posiciones óptimas de los discriminadores para medir la ESR de una muestra problema. Obsérvese que las superficies A y B son iguales.

Fig. 2. - Espectro de energía para el ^3H y el ^{14}C . D. S. y D. I. indican la posición de los discriminadores para cada canal.

relación de canales externos. Esta función se ajusta satisfactoriamente, mediante mínimos cuadrados, a una ecuación de segundo grado, del tipo:

$$(Ef) = \pm P (E. S. R.)^2 \pm Q (E. S. R.) \pm R.$$

siendo P, Q y R los parámetros de la ecuación, a calcular por este método.

En nuestro caso, el problema se complica por la presencia conjunta de dos emisores: ^3H y ^{14}C , en la misma muestra. En la fig. 2 se han representado sus espectros así como la posición óptima de los discriminadores. Como puede apreciarse, el ^3H es un emisor beta mucho menos energético que el ^{14}C , de tal manera que en el canal 1, las cuentas registradas proceden casi exclusivamente de este isótopo. No ocurre así en el canal 2, donde las cuentas registradas proceden de ambos isótopos, ya que el más energético produce un solapamiento con el espectro del menos energético.

Para calcular los dpm debidos a cada isótopo se trabaja con 6 patrones de ^{14}C y de 6 de ^3H , (cada juego de patrones poseerá, como antes, iguales dpm pero distintas extinciones). Con los patrones de ^{14}C , y por el procedimiento descrito, se obtiene la ecuación de eficiencia de conteo de ^{14}C en el canal 1:

$$Ef (^{14}\text{C})_1 = P_1 (E. S. R.)^2 + Q_1 (E. S. R.) + R_1$$

y en el canal 2:

$$EF (^{14}\text{C})_2 = P_2 (E. S. R.)^2 + Q_2 (E. S. R.) + R_2$$

Asímismo, con los patrones de ^3H se obtiene la expresión correspondiente para el canal 2:

$$Ef ({}^3\text{H})_2 = P_3 (\text{E.S.R.})^2 + Q_3 (\text{E.S.R.}) + R_3$$

Con los valores experimentales obtenidos con los patrones se calculan los nueve parámetros de las tres curvas de calibrado. Los canales 5 y 6 se utilizan exclusivamente para el cálculo de los valores de E.S.R., según se expresó anteriormente.

Sea ahora una muestra problema con ${}^3\text{H}$ y ${}^{14}\text{C}$ que en un tiempo t (min) ha acumulado C_2 cuentas en el canal 2 y C_1 cuentas en el canal 1. Dado que la interferencia de ${}^3\text{H}$ en el canal 1 puede despreciarse, los cpm debidas a ${}^{14}\text{C}$ en el canal 1 se obtendrán de:

$$\text{cpm } ({}^{14}\text{C})_1 = \frac{C_1}{t} - F$$

siendo F las cuentas acumuladas por el aparato, como radiación de fondo, en un minuto. Sus dpm vendrán dadas por:

$$\text{dpm } ({}^{14}\text{C}) = \frac{\text{cpm } ({}^{14}\text{C})_1}{\text{Ef } ({}^{14}\text{C})_1} = \frac{\frac{C_1}{t} - F}{P_1 (\text{E.S.R.})^2 + Q_1 (\text{E.S.R.}) + R_1}$$

En el canal 2, las cpm de ${}^3\text{H}$ deberán verificar:

$$\text{cpm } ({}^3\text{H})_2 = \frac{C_2}{t} - F - \text{cpm } ({}^{14}\text{C})_2 = \frac{C_2}{t} - F - \text{dpm } ({}^{14}\text{C}) \times \text{Ef } ({}^{14}\text{C})_2 =$$

$$= \frac{C_2}{t} - F - \text{dpm } ({}^{14}\text{C}) \left[P_2 (\text{E.S.R.})^2 + Q_2 (\text{E.S.R.}) + R_2 \right]$$

De donde, finalmente, la radiactividad debida al ${}^3\text{H}$ resulta:

$$\text{dpm } ({}^3\text{H}) = \frac{\text{cpm } ({}^3\text{H})_2}{\text{Ef } ({}^3\text{H})_2} = \frac{\frac{C_2}{t} - F - \text{dpm } ({}^{14}\text{C}) \left[P_2 (\text{E.S.R.})^2 + Q_2 (\text{E.S.R.}) + R_2 \right]}{P_3 (\text{E.S.R.})^2 + Q_3 (\text{E.S.R.}) + R_3}$$

que han sido las expresiones utilizadas.

La precisión aumenta considerablemente cuanto mayor es la radiactividad debida al ^3H frente a la debida al ^{14}C , por ello se ha procurado que en todas las experiencias, la del primero fuese 3 a 6 veces superior a la del segundo.

4. RESULTADOS

4. 1. - CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA COMO ENZIMA LIGADA A MEMBRANAS MICROSOMALES

Asumido el caracter microsomal de la HMG-CoA-reductasa, se ha comenzado por abordar el estudio de algunas de las propiedades de la enzima que son consecuencia de su vinculación a membranas. En este sentido se han llevado a cabo experiencias encaminadas a establecer el comportamiento de la actividad en función de la temperatura, la posible interacción con la fracción citosólica (sobrenadantes de 105.000 x g) y la propia solubilización de la proteína.

4. 1. 1. - Cambios en la actividad enzimática dependiente de la temperatura.

4. 1. 1. 1. - Representación de Arrhenius. Cálculo de las energías de activación

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de una reacción viene dada por la siguiente ecuación experimental sugerida por Arrhenius:

$$V_i = Ae^{-Ea / RT}$$

en que V_i es la velocidad inicial de la reacción, A es una constante denominada factor de frecuencia; Ea es la energía de activación; R es la constante de los gases perfectos ($1.987 \text{ calorías} \times \text{mol}^{-1} \times \text{°K}^{-1}$) y T la temperatura absoluta (°K) .

De la ecuación anterior se obtiene:

$$\text{Log } V_i = \text{Log } A - \frac{E_a}{2.303 R} - \frac{1}{T}$$

es decir, $\log V_i$ es una función lineal de la inversa de la temperatura absoluta. La representación correspondiente (representación de Arrhenius) dará una línea recta de pendiente: $-E_a / 2.303 R$ a partir de la cual puede calcularse la energía de activación.

No siempre se obtienen rectas al representar $\text{Log } V_i$ frente a $1/T$. Las enzimas ligadas a membrana frecuentemente exhiben discontinuidades que pueden atribuirse a interacciones lípido-proteína causadas por transiciones de fase en los lípidos de la bicapa. En estos casos, los tramos rectos separados por la discontinuidad ("temperatura de transición") presentan pendientes diferentes; por consiguiente, las energías de activación para esas temperaturas son, asimismo, diferentes.

Para determinar todos estos parámetros en el caso de la HMG-CoA reductasa de pollo, se han llevado a cabo reacciones a diferentes temperaturas. En la tabla 1 figuran las velocidades iniciales de transformación de HMG-CoA en MVA-lactona obtenidos para suspensiones microsomasales de hígado y cerebro de pollos 14 y 11 días de edad, respectivamente, a las temperaturas indicadas. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min. Experiencias previas indicaron que durante ese intervalo de tiempo, la velocidad de incorporación se mantiene constante.

En la fig. 3 aparecen las representaciones de Arrhenius, para ambos órganos. En el caso del hígado, la temperatura de transición se da a los 26.3°C; para temperaturas superiores la energía de activación

TABLA 1

Actividades específicas de la HMG- CoA reductasa hepática y cerebral para diferentes temperaturas de reacción (temp. reac.). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min. Pollos de 14 y 11 días de edad, respectivamente, sacrificados al comienzo de la fase luminosa. T(°K) = temperatura absoluta en grados Kelvin. Las actividades se expresan como media de tres valores \pm S.E.M.

temp. reac. (°C)	$10^{-3} \times T^{-1}$ (°K ⁻¹)	HIGADO		CEREBRO	
		act. esp. (pmoles \times min ⁻¹ \times mg ⁻¹)	log. act. esp.	act. esp. (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)	log act. esp.
10	3.534	136.8 \pm 1.9	2.136 \pm 0.006	86.8 \pm 2.1	1.939 \pm 0.011
15	3.472	208.8 \pm 10.5	2.320 \pm 0.022	164.2 \pm 10.5	2.215 \pm 0.028
20	3.413	291.3 \pm 2.9	2.464 \pm 0.004	242.8 \pm 6.1	2.385 \pm 0.011
23	3.378	371.2 \pm 7.2	2.570 \pm 0.008	323.1 \pm 6.9	2.509 \pm 0.009
27	3.333	479.8 \pm 32.9	2.681 \pm 0.029	384.0 \pm 9.4	2.584 \pm 0.011
30	3.300	555.8 \pm 10.6	2.745 \pm 0.008	411.2 \pm 6.8	2.614 \pm 0.007
33	3.268	618.6 \pm 7.5	2.791 \pm 0.005	476.5 \pm 13.7	2.678 \pm 0.012
37	3.226	739.4 \pm 26.4	2.869 \pm 0.016	582.9 \pm 22.7	2.766 \pm 0.017

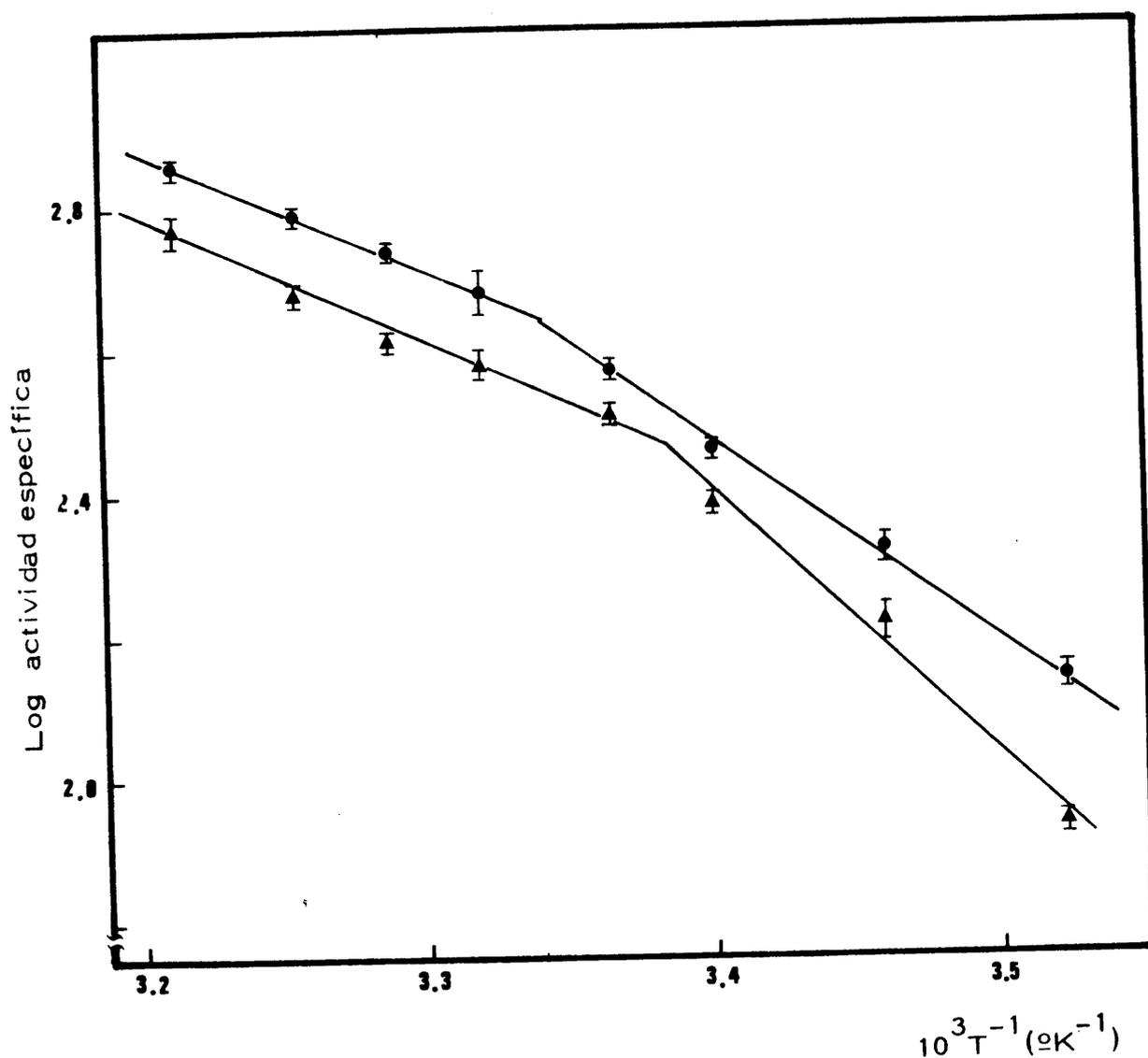


Fig. 3. - Representación de Arrhenius para la actividad HMG-CoA reductasa hepática (●) y cerebral (▲) de pollos de 14 y 11 días, respectivamente. Se han partido de actividades específicas expresadas en $\mu\text{moles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Cada punto representa la media de 3 valores \pm S. E. M.

obtenida es de 7.93Kcal/ mol ($|r| = 0.99$) y para temperaturas inferiores, de 12.53Kcal/ mol ($|r| = 0.99$). En el caso del cerebro se obtiene un valor de 22.4°C para la temperatura de transición. Asimismo se obtiene una energía de activación de 7.49Kcal/ mol ($|r| = 0.99$) para temperaturas superiores y 16.44Kcal/ ml ($|r| = 0.99$) para temperaturas inferiores. Todo ello se esquematiza en las dos primeras columnas de la tabla 2.

4.1.1.2. - Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la temperatura de transición

Dado que el colesterol incrementa la rigidez de las membranas en las que se encuentra presente pareció conveniente contrastar las gráficas obtenidas para pollos alimentados con dieta estandar con las de pollos alimentados desde su nacimiento con una dieta suplementada con colesterol al 2 %, ya que era posible que de este modo se acumulase en membranas hasta el punto de modificar algunos de sus parámetros dependientes de la temperatura. La fuerte inhibición encontrada en hígado, bajo esta situación, hizo imposible representar gráficamente los valores obtenidos.

Para el cerebro, dichos valores se agrupan en la tabla 3 junto a sus correspondientes temperaturas de reacción. La temperatura de transición encontrada a partir de estos datos es de 22.3°C. Asimismo se encuentran unas energías de activación de 6.88Kcal/ mol ($|r| = 0.99$) para valores superiores de temperatura y de 16.57Kcal/ mol ($|r| = 0.99$) para valores inferiores. Estos valores se han resumido, junto con los anteriores, en la tabla 2.

TABLA 2

Representación de Arrhenius. Se han calculado las rectas de regresión para cada tramo por mínimos cuadrados. Los coeficientes de correlación se dan en valores absolutos. Las energías de activación, halladas a partir de las pendientes, se expresan en $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Las temperaturas de transición, en $^{\circ}\text{C}$, se han calculado analíticamente como puntos de intersección de las rectas de regresión. t° = temperatura ; t_t = temperatura de transición.

	Dieta estandar				Cerebro	
	Hígado		Cerebro		dieta	colesterol
	$t^{\circ} > t_t$	$t^{\circ} < t_t$	$t^{\circ} > t_t$	$t^{\circ} < t_t$	$t^{\circ} > t_t$	$t^{\circ} < t_t$
Coefficiente de correlación	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
pendiente de la recta de m. c.	-1.732	- 2.739	- 1.637	- 3.592	- 1.504	- 3.620
Energía de activación	7.93	12.53	7.49	16.44	6.88	16.57
temperatura de transición	26.3		22.4		22.3	

TABLA 3

Actividades específicas, a diferentes temperaturas, de la HMG- CoA reductasa cerebral en pollos alimentados desde la eclosión con una dieta suplementada con colesterol al 2%. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min. Pollos de 11 días sacrificados al comienzo de la fase luminosa. Las actividades se expresan como media de tres valores \pm S.E.M.

temp. reacc. (°C)	$10^3 \times T^{-1}$ (°K ⁻¹)	act. esp. (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)	log. act. específica
10	3.534	5.99 \pm 1.3	1.777 \pm 0.009
15	3.472	115.6 \pm 5.6	2.063 \pm 0.021
20	3.413	172.1 \pm 5.5	2.236 \pm 0.014
23	3.378	224.9 \pm 4.0	2.352 \pm 0.008
27	3.333	268.8 \pm 6.4	2.429 \pm 0.010
30	3.300	282.4 \pm 13.3	2.451 \pm 0.020
33	3.268	319.8 \pm 3.3	2.505 \pm 0.005
37	3.226	390.5 \pm 9.8	2.592 \pm 0.011

De la comparación con las actividades obtenidas de pollos alimentados con dieta estandar puede concluirse que ni la temperatura de tansición ni las energías de activación son significativamente distintas. Estos hechos se constatan graficamente en la fig. 4.

4. 1. 1. 3. - Inactivación térmica de la enzima

Otro aspecto importante del comportamiento de una enzima frente a la temperatura es el estudio de la pérdida de su actividad por efecto del calor. En este sentido se incubaron diversas alícuotas de una misma suspensión microsomal de hígado con 4 mg de proteínas por ml a 30, 50 y 70 °C durante intervalos de tiempo crecientes. Una vez incubados, los extractos se devolvían de nuevo a su temperatura habitual de 4°C hasta el momento de la reacción, que transcurrió, en todos los casos, a 37°C. Los valores encontrados se recogen en la tabla 4.

En la fig. 5 se han representado las actividades residuales de cada muestra frente a los tiempos de incubación a 30°C, 50°C y 70°C. Dichas actividades se expresan en tantos por ciento respecto a la de un control mantenido todo el tiempo a 4°C. Como puede apreciarse, a los 5 min. de incubación a 70 °C, la actividad se reduce hasta un 50% aproximadamente. Este mismo porcentaje se consigue a los 40 min. de incubación a 50°C necesitándose unas tres horas para lograr el mismo efecto a 30 °C.

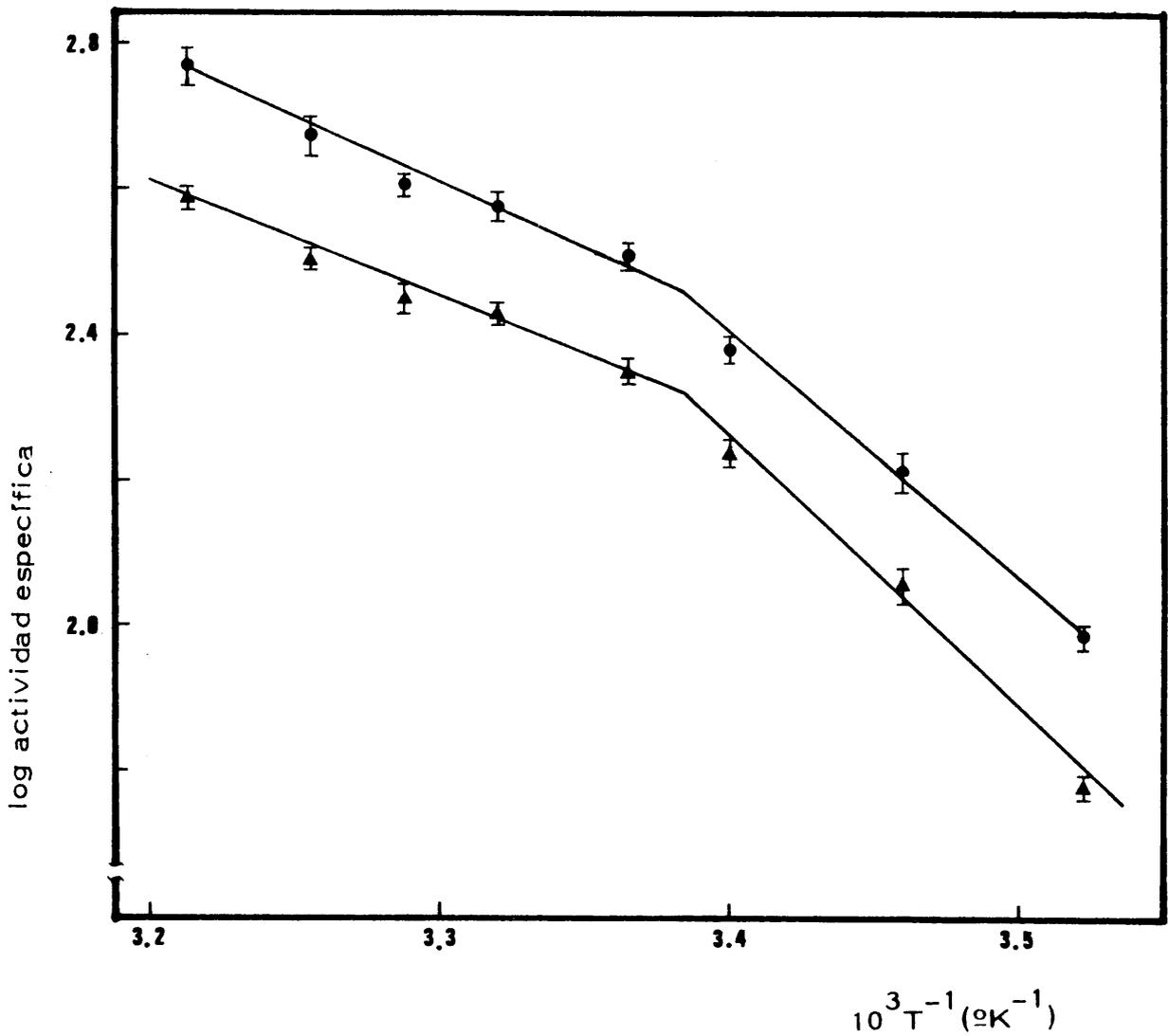


Fig. 4.- Representación de Arrhenius para la HMG-CoA reductasa cerebral de pollos de 11 días alimentados con una dieta estandar (●) y con dieta que contenía un 2 % de colesterol (▲), desde el día de la eclosión. Se han partido de actividades específicas expresadas en $\mu\text{moles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Cada punto representa la media de 3 valores \pm S. E. M.

TABLA 4

Inactivación térmica del enzima. Se expresan las actividades específicas de microsomas hepáticos preincubados a 30° , 50° y 70° C durante los tiempos indicados. La temperatura de reacción fue en todos los casos de 37° C . Pollos de trece días de edad, sacrificados al comienzo del periodo luminoso del ciclo. Las actividades se expresan como media de tres valores ± S.E.M.

tiempo (min)	TEMPERATURAS ENSAYADAS					
	30°		50°		70°	
	Act. esp. pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹	%	Act. esp. pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹	%	Act. esp. pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹	%
0	688.8 ± 30.2	100	688.8 ± 30.2	100	688.8 ± 30.2	100
5	696.8 ± 28.8	101.2	616.6 ± 60.0	92.4	368.4 ± 10.1	53.5
15	659.8 ± 37.4	95.8	546.7 ± 34.5	81.9	103.1 ± 14.1	15.0
60	665.4 ± 5.2	96.6	176.9 ± 12.0	25.7	14.5 ± 0.2	2.1
180	359.5 ± 7.5	52.2	37.2 ± 7.1	5.4	7.9 ± 0.4	1.1
360	73.7 ± 3.0	10.7	13.4 ± 1.3	1.9	6.7 ± 0.3	1.0

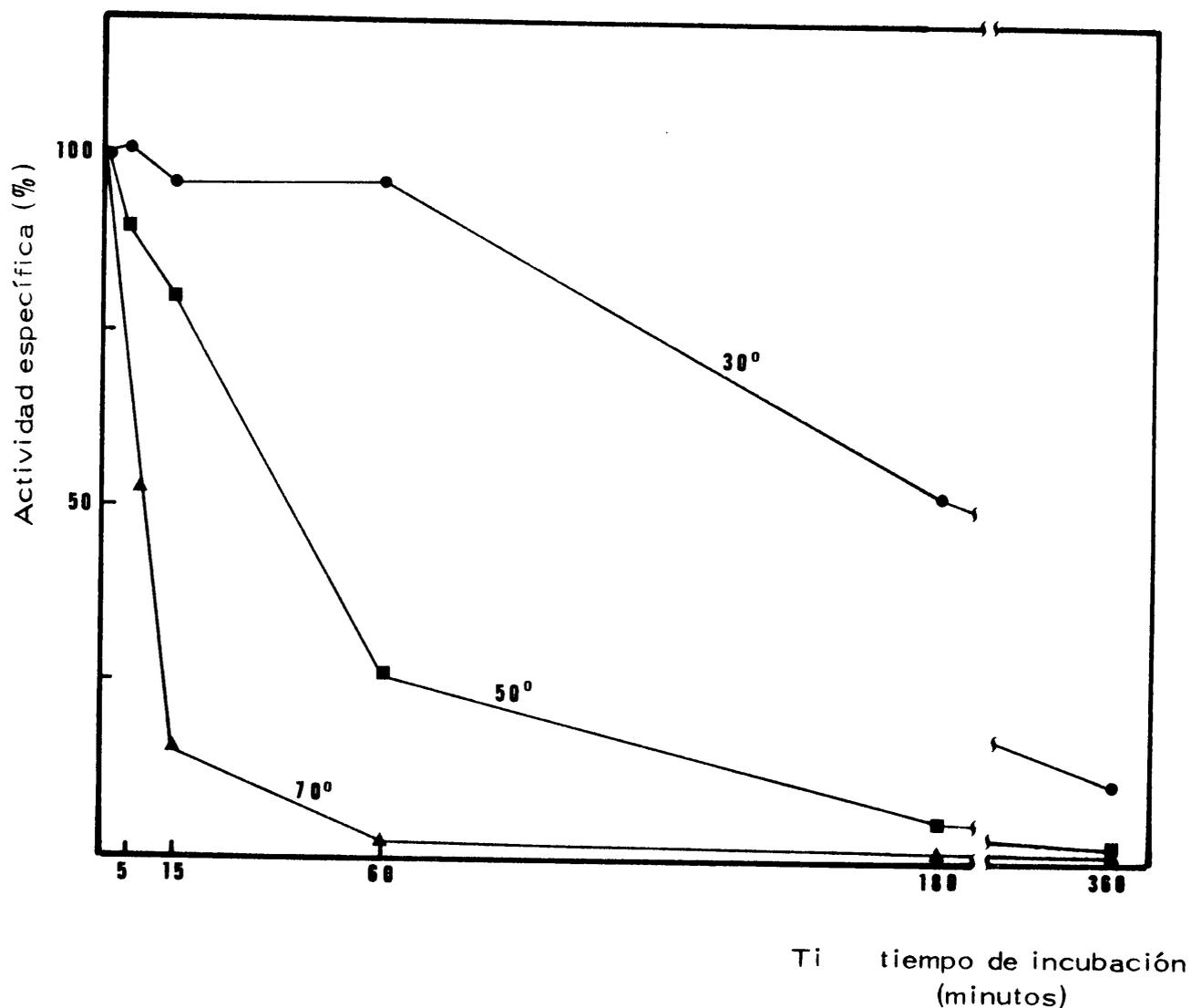


Fig. 5. - Perfiles de inactivación térmica de la enzima a 30° (●), 50°(■) y 70°C (▲). Las actividades se expresan en tanto por ciento de la de un control mantenido a 4°C hasta el momento de la reacción, que en todos los casos, se llevó a cabo a la temperatura habitual de 37°C.

4.1.2. - Efecto de los sobrenadantes de 105.000 x g sobre la actividad microsomal.

Reiteradamente se ha mencionado la existencia, en ratas, de dos formas de HMG-CoA reductasa hepática; una de ellas inactiva y fosforilada y la otra, activa y defosforilada. Ambas formas serían interconvertibles enzimáticamente mediante un sistema citosólico fosforilasa-fosfatasa (183, 184)

Para detectar la posible existencia de un sistema similar en hígado de pollo, se realizó una nueva experiencia para la que se partió de tres supuestos fundamentales:

1. - En primer lugar, que el sistema fosforilante debe carecer prácticamente de actividad una vez consumido el ATP contenido en las muestras. Es por tanto la actividad fosfatásica la única detectable, en tanto no se aporte el mencionado nucleótido desde el exterior.

2. - Que la actividad fosfatásica tiene escasa incidencia, si no nula, a la temperatura habitual de manipulación de los extractos(4°C).

3. - Que el F^{-} es un potente inhibidor de las fosfatasas.

En la experiencia llevada a cabo, alícuotas de un mismo sedimento microsomal se incubaron con sus sobrenadantes de 105.000 x g a 37°C, durante intervalos de tiempo crecientes(0, 30, 60 y 90 min). Una parte de estas incubaciones se hizo en presencia de FK (50 mM). La relación proteína microsomal / proteína soluble se mantuvo alrededor de 1.5/1. Tras centrifugar de nuevo a 105.000 x g se determinó la actividad HMG-CoA reductasa microsomal en cada una de las muestras.

En el sistema experimental descrito, la actividad fosfatásica se manifestaría como un incremento de la actividad HMG-CoA reductasa en las suspensiones preincubadas en ausencia de F^- , inexistente, al menos en parte, en las suspensiones preincubadas en presencia de F^- .

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. El nivel de significación de la t de Student encontrado para la hipótesis de que la actividad a los 90 min de incubación en ausencia de F^- sea distinta a la encontrada en suspensiones no preincubadas, es: $P < 0.5$. Asimismo, el nivel de significación estadística de que los incubados 90 min en ausencia de F^- sea distinta a la de los incubados con F^- es también: $P < 0.5$.

Por consiguiente el ligero incremento de actividad observado a medida que se incrementa el tiempo de incubación, atribuible en principio a la actividad fosfatásica de los sobrenadantes ya que no se produce en presencia de F^- (ver tabla 5), no es estadísticamente significativo bajo las condiciones del ensayo.

4.1.3. - Solubilización parcial de la enzima. Técnica del "freezing-thawing"

El siguiente problema abordado fue el de la solubilización de la enzima. El procedimiento elegido es el del "freezing-thawing" (congelación-descongelación), descrito por Begy col.(185). Para ello se partió de una suspensión microsomal de hígado con concentración proteica conocida. Dicha suspensión se centrifugó nuevamente a $105.000 \times g$, desechándose el sobrenadante. El sedimento obtenido se sometió a congelación brusca a $-20^\circ C$, temperatura a la que permaneció durante varias horas. Posterior-

TABLA 5

Efecto, sobre la HMG-CoA reductasa, de la incubación de microsomas hepáticos con sobrenadantes de 105000 x g en presencia y ausencia de F^- , a 37 °C, durante intervalos crecientes de tiempo. Pollos de 13 días de edad, sacrificados al comienzo del periodo luminoso. Las actividades se han expresado como medias de 4 valores \pm S.E.M.

Tiempo de preincubación (min)	Act. esp. (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)	
	Sin F^-	con F^-
0	643.0 \pm 17.5	-----
30	676.0 \pm 11.2	676.7 \pm 13.0
60	685.8 \pm 41.2	673.0 \pm 1.5
90	695.6 \pm 21.4	665.2 \pm 20.0

mente se dejó descongelar la muestra a temperatura ambiente, resuspendiéndose luego en un volumen dado de tampón de extracción. La suspensión se volvió a centrifugar a $105.000 \times g$, separándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió de nuevo en tampón y se centrifugó otra vez a $105.000 \times g$. Este último sobrenadante, mezclado con el anterior contiene la fracción de enzima solubilizado, en tanto que en el sedimento debe quedar el resto de la actividad inicial. Finalmente se determinaron ambas actividades así como la de un control constituido por una alícuota de la suspensión original mantenida todo el tiempo a $4^{\circ}C$.

Los resultados se muestran en la tabla 6. En ella se recogen los valores obtenidos para cada una de las tres fracciones. Las actividades totales se han calculado como:

$$A_t = P \times V \times \text{Act. esp.} \times f.$$

donde es:

$$A_t = \text{Actividad total en pmoles} \times \text{min}^{-1}$$

$$P = \text{Concentración proteica en mg de proteínas} \times \text{ml}^{-1}$$

$$V = \text{Volumen de la fracción en ml.}$$

$$\text{Act. esp.} = \text{Actividad específica en pmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

$$f = \text{Factor de dilución generado durante el proceso.}$$

La suma de las actividades totales de la enzima solubilizado y residual constituyen el 97.4% de la actividad total inicial, lo que supone una recuperación muy aceptable.

El rendimiento de la solubilización calculado es del 48.7% . Como también puede apreciarse en la tabla, la actividad específica de la enzima solubilizado es menor, en tanto que la del enzima residual aumenta.

TABLA 6

Solubilización parcial de la enzima por el método de congelación - descongelación. Se muestran las actividades totales tanto de la suspensión microsomal de partida (susp. micr. inicial), como de las actividades microsomal residual y soluble, obtenidas en el sedimento y en el sobrenadante, respectivamente, tras el tratamiento. Conc. prot. = concentración proteica de cada fracción; Act. esp. = Actividad específica de la HMG-CoA reductasa en cada fracción; V = volumen obtenido de cada una de ellas; F = factor de dilución generado durante el proceso; Act. total = actividad total. Pollos de 7 días de edad, sacrificados al comienzo de la fase luminosa. Las actividades se dan como medias de tres valores \pm S.E.M.

	Conc. prot. (mg / ml)	Activ. esp. (pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	F	V	Activ. total (pmoles x min ⁻¹)
Susp. micr.					
inicial	31.15	405.1 \pm 2.2	0.167	8.0	16858.8
Sobrenadante	5.15	166.5 \pm 0.5	1	9.3	7974.5
Sedimento	23.82	565.3 \pm 1.0	0.125	5.0	8415.9

Una vez solubilizada la enzima, se intentó construir su curva de Arrhenius a fin de comprobar las modificaciones sufridas respecto a la enzima particulada. Ello no fué posible, sin embargo, dado que la reductasa en estas condiciones experimenta una inactivación prácticamente completa para temperaturas inferiores a los 20-25°C.

4. 2. - VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA A LO LAR- GO DEL DIA. INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN

El efecto que la alimentación posee sobre la propia biosíntesis de colesterol endógeno y sobre la HMG-CoA reductasa, enzima sobre la que recae gran parte de la regulación de su ruta biosintética, es de trascendental importancia para comprender la dinámica global del proceso diario de recambio de este compuesto en el organismo.

En las experiencias que se describen a continuación, realizadas bajo este prisma, se ha estudiado, primeramente, el patrón de actividad diurna de la HMG-CoA reductasa en pollos alimentados con una dieta equilibrada estandar, para abordar a continuación problemas análogos bajo dos situaciones distintas: la alimentación con una dieta rica en colesterol y el ayuno.

4. 2. 1. - Evolución diurna de la actividad en animales alimentados con dieta estandar

Dado que los pollos realizan su ingesta durante el día parece oportuno registrar la evolución de dicha actividad a lo largo de un ciclo completo de 24 horas para establecer, en primer lugar la existencia o no de actividad rítmica paralela a la encontrada en rata, en segundo lugar comprobar si se mantiene la correlación con el periodo de ingesta que

apuntan numerosos autores para este último origen. Con esta finalidad se han realizado experiencias en tres órganos diferentes: hígado, asa duodenal y cerebro.

4. 2. 1. 1. - Evolución en hígado

Se han llevado a cabo determinaciones sistemáticas de la actividad HMG-CoA reductasa hepática en pollos de nueve días de edad, durante un periodo de veinticuatro horas consecutivas. Los valores encontrados se muestran en la tabla 7. En ella se indica el ciclo de iluminación y la hora del día en que fueron sacrificados los animales. Dichos valores se han representado en la fig. 6, donde se revela claramente la presencia de un ritmo diurno de actividad, inverso al descrito en rata, cuyo cenit, situado en la mitad de la fase luminosa del ciclo (a las seis horas de comenzar la iluminación) es 2.83 veces la actividad del nadir, situado en mitad de la fase oscura. Se mantiene, por tanto, la correlación mencionada anteriormente entre el máximo de actividad y el periodo de ingesta.

Asumiendo que el área comprendida entre la curva y el eje de abscisas durante 24 h corresponde al mevalónico producido "in vitro" durante ese mismo periodo de tiempo, se ha calculado la cantidad porcentual de éste acumulado a lo largo de un día (tabla 8). Los valores obtenidos, representados frente al tiempo, dan una idea del ritmo de producción de dicho ácido mevalónico durante el ciclo completo. Como puede verse en la fig. 7, la curva obtenida es, obviamente de naturaleza sigmoideal. Tomando como origen el punto medio de la fase oscura se encuentra que el cincuenta por ciento del mevalónico se produce, probablemente, algo después del cenit, hecho lógico si se tiene en cuenta que el ascenso de la actividad

TABLA 7

Ritmo diurno de actividad HMG-CoA reductasa en hígado de pollos de 9 días de edad. En la Tabla se indica el ciclo de iluminación con el número de horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) y la hora del día en que fueron sacrificados los animales. Las actividades específicas se expresan como medias de seis valores \pm S.E.M.

Ciclo de iluminación			
hora del día	tiempo de exposición (h)		Actividad específica (pmoles c mg ⁻¹ x min ⁻¹)
10:00	3	□	768.8 \pm 65.0
13:00	6	□	985.9 \pm 67.6
16:00	9	□	817.4 \pm 62.9
19:00	12	□	635.2 \pm 45.2
22:00	3	▨	426.8 \pm 28.2
01:00	6	▨	348.8 \pm 20.0
07:00	12	▨	367.3 \pm 50.1

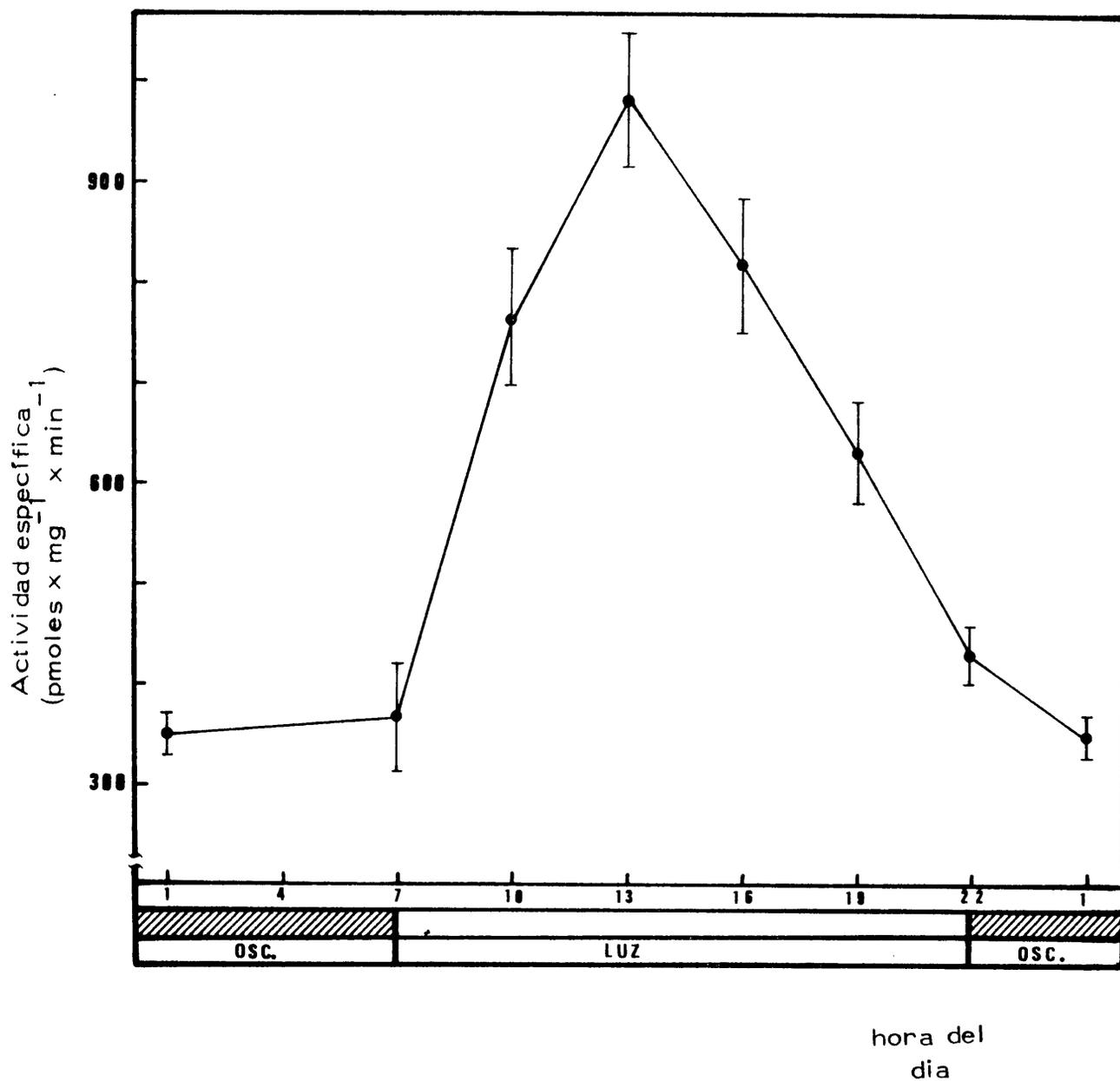


Fig. 6. - Evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa de hígado de pollos de nueve días de edad. Cada punto representa la media de seis valores \pm S. E. M.

TABLA 8

Producción hepática de ácido mevalónico a lo largo del día. Tomando como origen el punto medio de la fase oscura se han calculado las áreas porcentuales y acumuladas para cada intervalo de tiempo, a partir de los datos contenidos en la Tabla 7, y delimitados entre el perfil de actividad y el eje de abscisas. u = unidades.

<u>Ciclo de iluminación</u>				
hora del día	tiempo de exposición	Area (u. arbitrarias)	Area (%)	Area acumulada
01:07 a 07:00	6-12	0.48	0.95	0.95
07:00 a 10:00	0-3	5.75	11.43	12.38
10.00 a 13:00	3-6	13.87	27.56	39.95
13:00 a 16:00	6-9	14.51	18.83	68.78
16:00 a 19:00	9-12	9.91	19.69	88.47
19:00 a 22:00	0-3	4.78	9.50	97.97
22:00 a 01:00	3-6	1.02	2.03	100

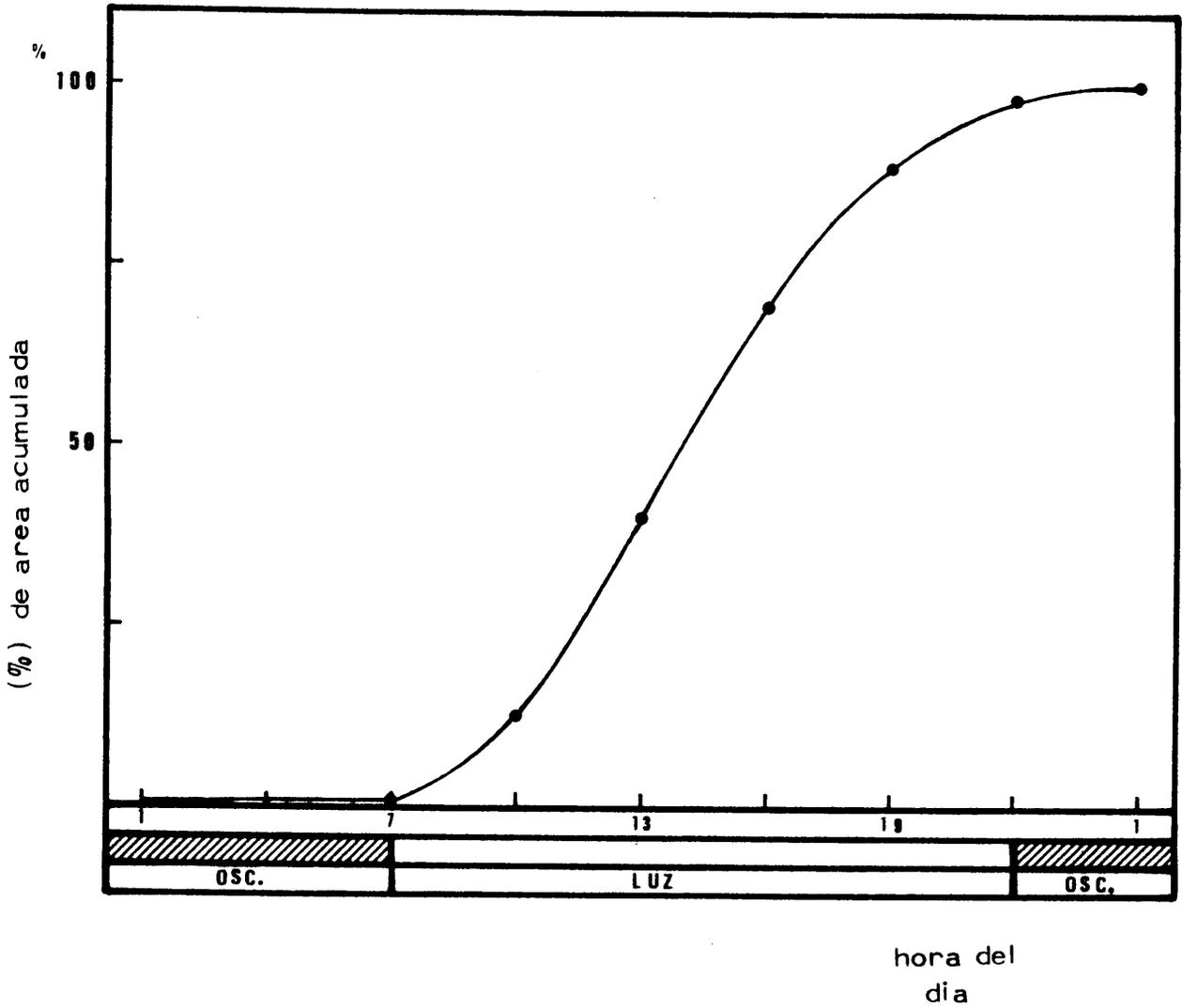


Fig. 7.- Producción hepática de ácido mevalónico a lo largo del día. Cada punto representa el tanto por ciento de actividad acumulada desde el punto medio de la fase oscura hasta la hora indicada en cada caso. Explicación en el texto.

es más brusco que el descenso de la misma fig. 6

4. 2. 1. 2. - Evolución en tubo digestivo

Mediante un planteamiento análogo al del hígado, se ha llevado a cabo el seguimiento de la actividad HMG-CoA reductasa duodenal, a lo largo del día. Los resultados contenidos en la tabla 9, muestran que también en duodeno existe un ritmo en fase con el hígado cuya actividad es en el cenit 2.70 veces la del nadir. En la fig. 8 se han representado estos valores en función del tiempo.

4. 2. 1. 3. - Evolución en cerebro.

Los resultados obtenidos para el cerebro (tabla 10) no muestran variaciones importantes en función de la hora del día, indicando que la HMG-CoA reductasa carece, para este órgano, de ritmo diurno de actividad. Este hecho se ilustra en la fig. 9 obtenida a partir de los datos de la tabla 10 y que corresponden a pollos de seis días de edad.

4. 2. 1. 4. - Variaciones diurnas a lo largo del desarrollo postnatal

Demostrada la existencia de ritmos diurnos de actividad reductasa en hígado y en la región duodenal de tubo digestivo se suscitaron dos cuestiones importantes para establecer su naturaleza. En primer lugar quedaba por establecer si estos ritmos de actividad preexisten cuando

TABLA 9

Ritmo diurno de actividad HMG-CoA en asa duodenal de pollos de nueve días de edad. En la tabla se indica el ciclo de iluminación con el número de horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) y la hora del día en que fueron sacrificados los animales. Las actividades específicas se expresan como medias de seis valores \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación		
hora del día	tiempo de exposición	Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)
10:00	3	167.1 \pm 34.4
13:00	6	176.9 \pm 21.7
16:00	9	85.5 \pm 5.6
19:00	12	67.0 \pm 3.2
22:00	3	109.2 \pm 4.3
01:00	6	110.7 \pm 22.8
07:00	12	65.6 \pm 3.2

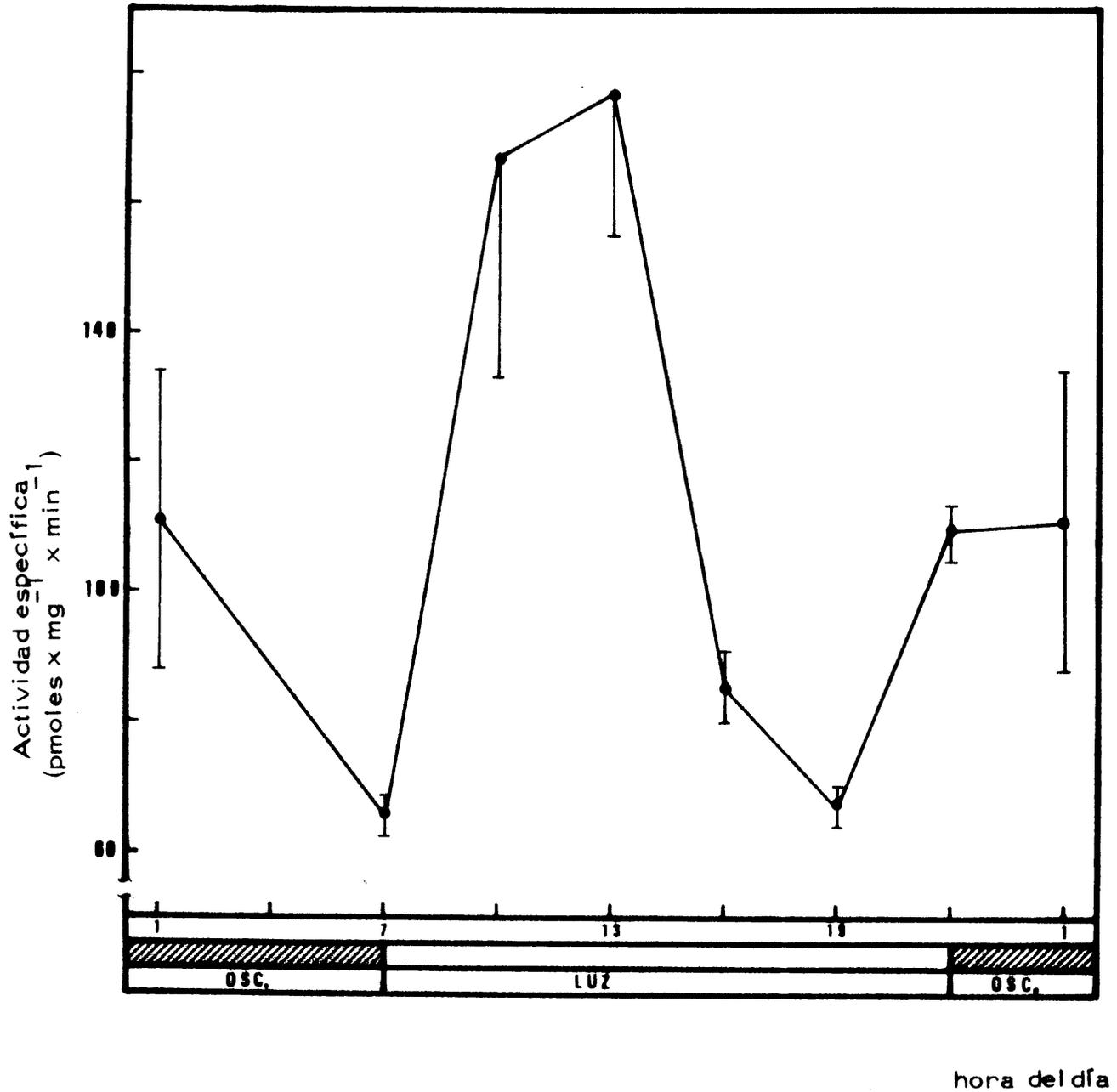


Fig. 8.- Evolución diurna de la actividad duodenal de la HMG-CoA reductasa en pollos de nueve días de edad. Cada punto representa la media de seis valores \pm S. E. M.

TABLA 10

Evolución diurna de la actividad cerebral de la HMG-CoA reductasa en pollos de seis días de edad. En la tabla se indica el ciclo de iluminación con el número de horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) y la hora del día a la que fueron sacrificados los animales. Las actividades específicas se expresan como medias de seis valores \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación		
hora del día	tiempo de exposición	Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)
10:00	3	369.7 \pm 30.0
13:00	6	342.1 \pm 19.7
16:00	9	384.8 \pm 39.3
19:00	12	429.0 \pm 40.9
22:00	3	420.5 \pm 22.1
01:00	6	450.9 \pm 44.7
07:00	12	456.6 \pm 21.4

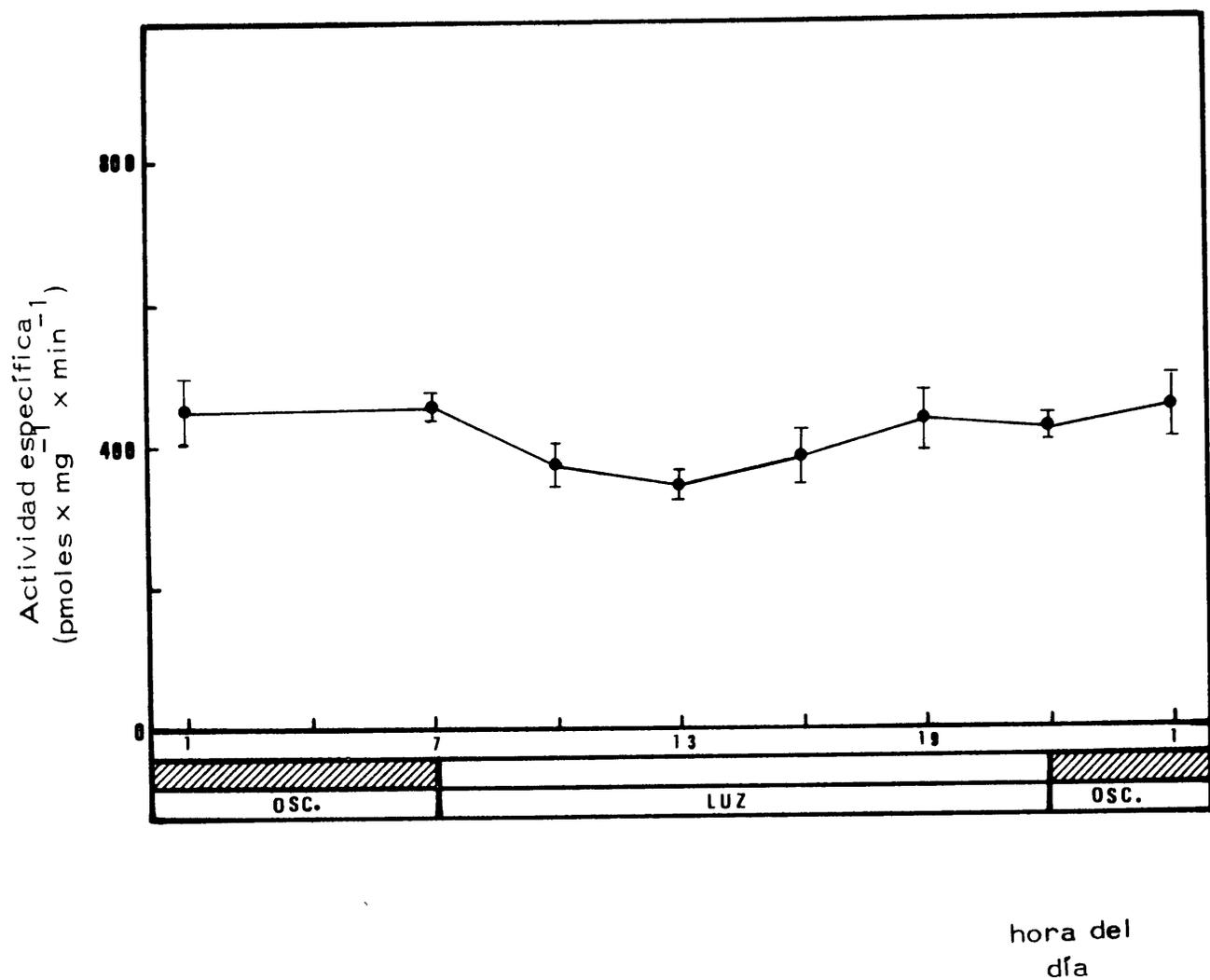


Fig. 9.- Evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa de cerebro de pollos de seis días de edad. Cada punto representa la media de seis valores \pm S. E. M.

tiene lugar la eclosión o por el contrario se generan durante la primera etapa del desarrollo postnatal, plausiblemente, como respuesta al cambio del modo de nutrición fetal al modo de nutrición adulta; hecho que reafirmaría nuevamente el papel central de la alimentación. La segunda cuestión se planteó en torno a la contribución global de cada órgano y al significado que el ritmo podía tener en ella.

Para resolver ambos interrogantes se registraron primeramente las actividades máximas y mínimas de la HMG-CoA reductasa hepática y duodenal durante las dos primeras semanas de vida. Los valores encontrados para ambos órganos se han resumido en las tablas 11 y 12 respectivamente. Esos mismos valores se han representado gráficamente en la fig. 10 y fig. 11. En ambos casos el ritmo surge durante la primera semana del desarrollo postnatal, incrementándose su amplitud hasta alcanzar un valor aproximadamente constante alrededor del noveno-décimo día después de la eclosión.

A continuación se estableció la contribución global del hígado, en el cenit y en el nadir, refiriéndose los valores de actividad al peso medio de órgano encontrado para cada edad. Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 13 ; con ellos se han construido las gráficas de la fig. 12. Destaca en ellas un gran paralelismo con las curvas de actividad específica (fig. 10). Como en estas, la amplitud del ritmo crece rápidamente hasta el décimo día, haciéndolo lentamente a partir de este punto y hasta el día 14 (fig. 13). Estos resultados ponen además de manifiesto que al fuerte incremento en la actividad específica observado durante los primeros días de vida se solapa el propio aumento del peso del órgano potenciándose aún más el efecto, de tal modo que mientras la máxima actividad

TABLA 11

Valores de HMG-CoA reductasa hepática en el cenit y en el nadir de su actividad diurna durante las dos primeras semanas de vida. Se recogen las actividades específicas medias de cuatro valores. \pm S. E. M. La amplitud corresponde a la diferencia entre ambas.

Edad (días)	Actividad específica ($\text{pmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		
	Nadir	Cenit	Amplitud
4	14.7 \pm 1.3	23.4 \pm 0.5	8.7
7	121.1 \pm 3.0	426.4 \pm 19.5	305.3
10	527.5 \pm 4.1	1064.7 \pm 14.3	537.2
12	591.0 \pm 32.3	1057.5 \pm 47.1	466.5
14	577.2 \pm 12.5	1152.7 \pm 36.3	575.5

TABLA 12

Valores de HMG-CoA reductasa duodenal en el cenit y en el nadir de su actividad diurna durante las dos primeras semanas de vida. Se recogen las actividades específicas medias de cuatro valores \pm S. E. M. La amplitud corresponde a la diferencia entre ambas.

Edad (días)	Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)		
	Nadir	Cenit	Amplitud
4	24.8 \pm 1.7	50.3 \pm 7.2	25.5
7	118.4 \pm 2.4	145.6 \pm 4.3	27.2
10	176.3 \pm 3.7	264.0 \pm 5.9	87.7
14	101.5 \pm 22.7	173.7 \pm 4.4	72.2

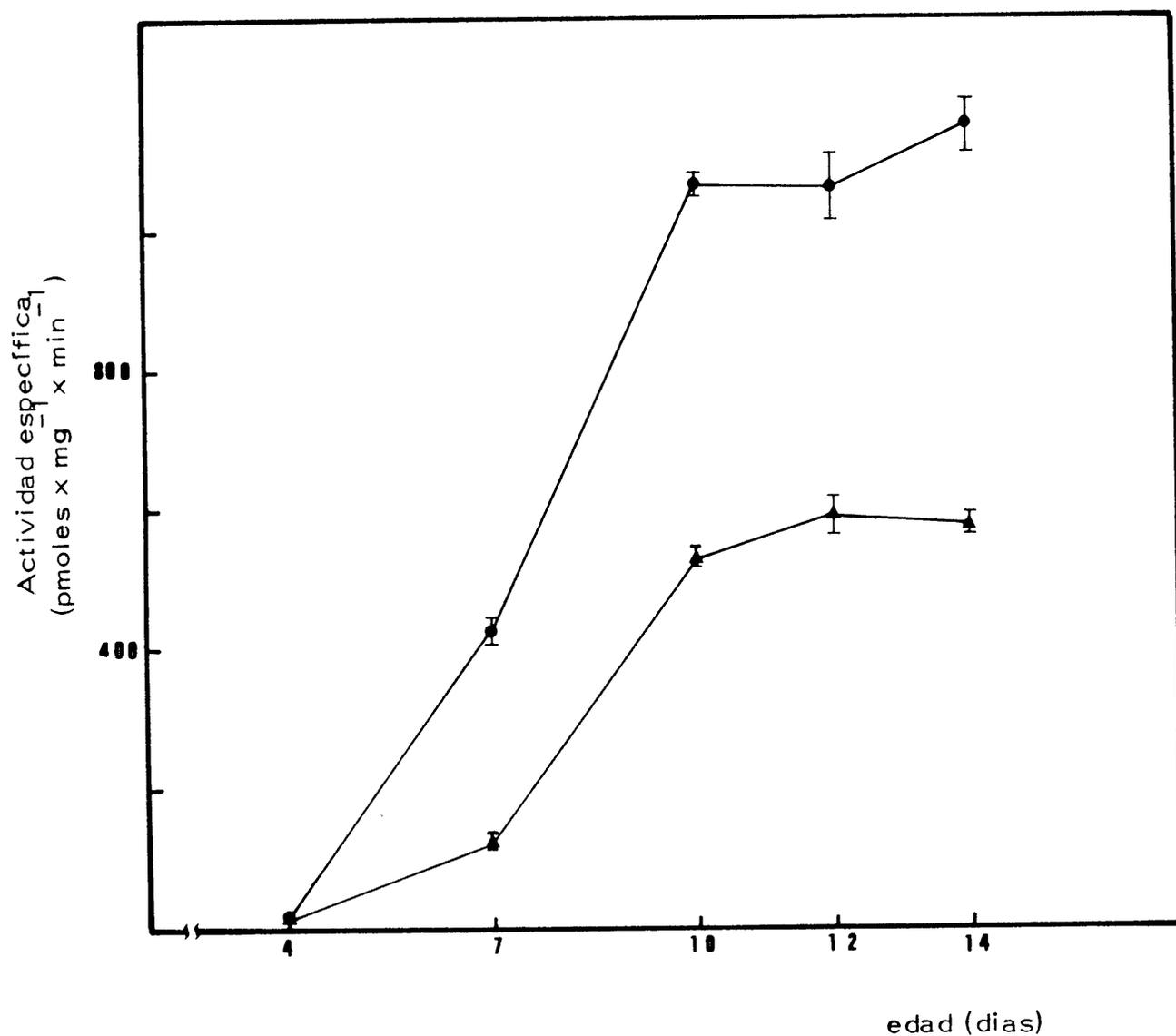


Fig. 10.- Actividad máxima (●) y mínima (▲) de la HMG-CoA reductasa hepática durante las dos primeras semanas de vida. Se expresan las medias de cuatro valores \pm S. E. M.

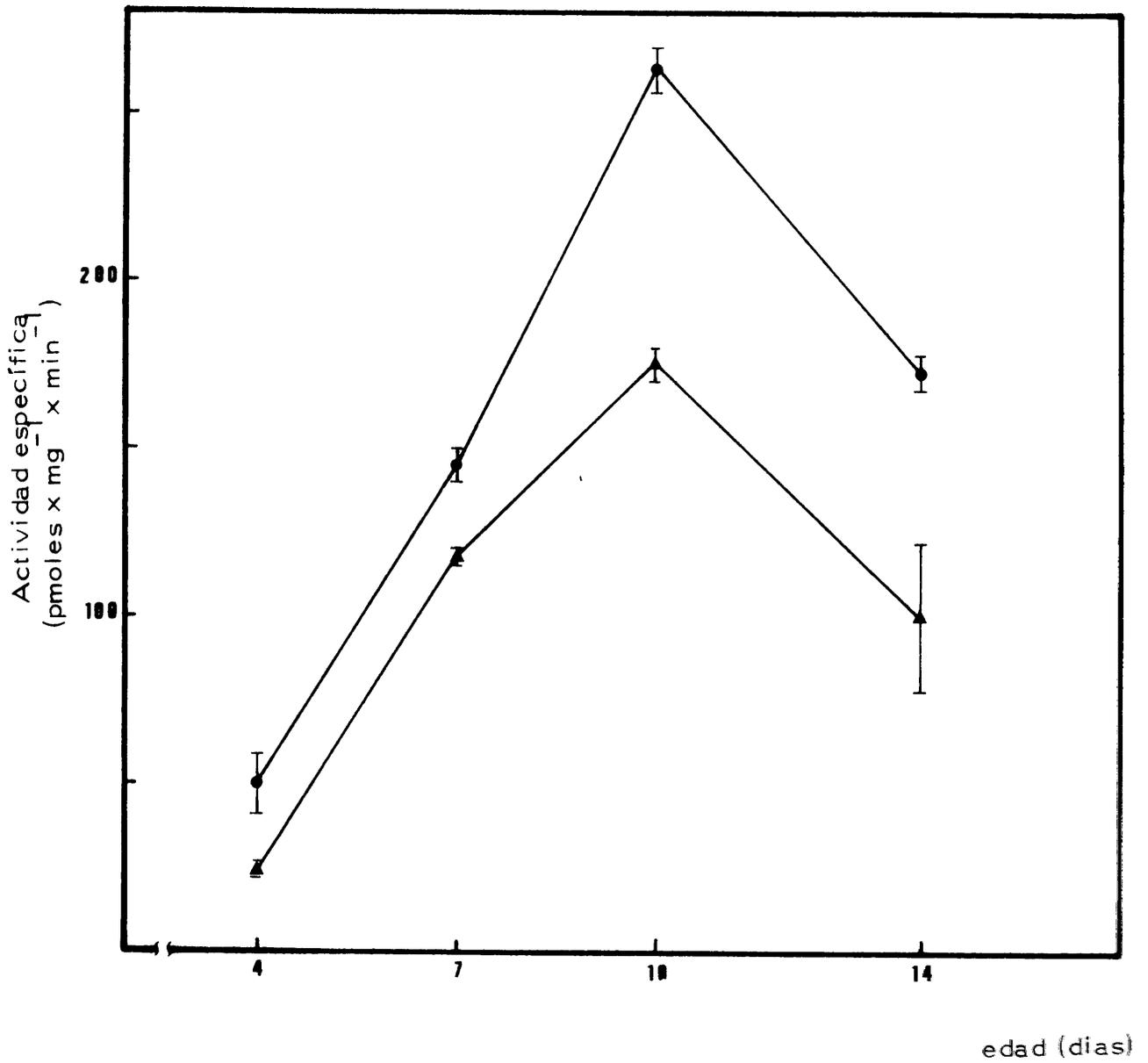


Fig. 11. - Actividad máxima (●) y mínima (▲) de la HMG-CoA reductasa duodenal durante las dos primeras semanas de vida. Se expresan las medias de cuatro valores \pm S. E. M.

TABLA 13

Valores de la HMG-CoA reductasa hepática en el cenit y en el nadir de sus actividad diurna durante las dos primeras semanas de vida, referidas al peso medio de órgano encontrados para cada edad y calculadas a partir de los datos de la tabla 11. La amplitud corresponde a la diferencia entre ambos valores. Prot. micros. = proteínas microsoma-les por peso de tejido.

Edad (días)	Nadir			Cenit			Amplitud
	Peso medio organo (g)	Prot. micros. (mg x g org ⁻¹)	Act. total (pmoles x min ⁻¹)	Peso medio organo (g)	Prot. micros. (mg x g org ⁻¹)	Act. total (pmoles x min ⁻¹)	
4	1.55 ± 0.03	10.66	242.8	1.62 ± 0.09	10.94	414.7	171.9
7	1.93 ± 0.04	8.69	2031.0	2.24 ± 0.20	8.00	7641.0	5610.0
10	2.54 ± 0.06	7.39	9901.4	2.80 ± 0.19	8.38	24982.1	15080.7
12	3.46 ± 0.15	7.96	16277.0	3.52 ± 0.20	8.47	31528.7	15251.7
14	3.42 ± 0.11	7.34	14489.3	4.39 ± 0.30	7.27	36788.7	22299.4

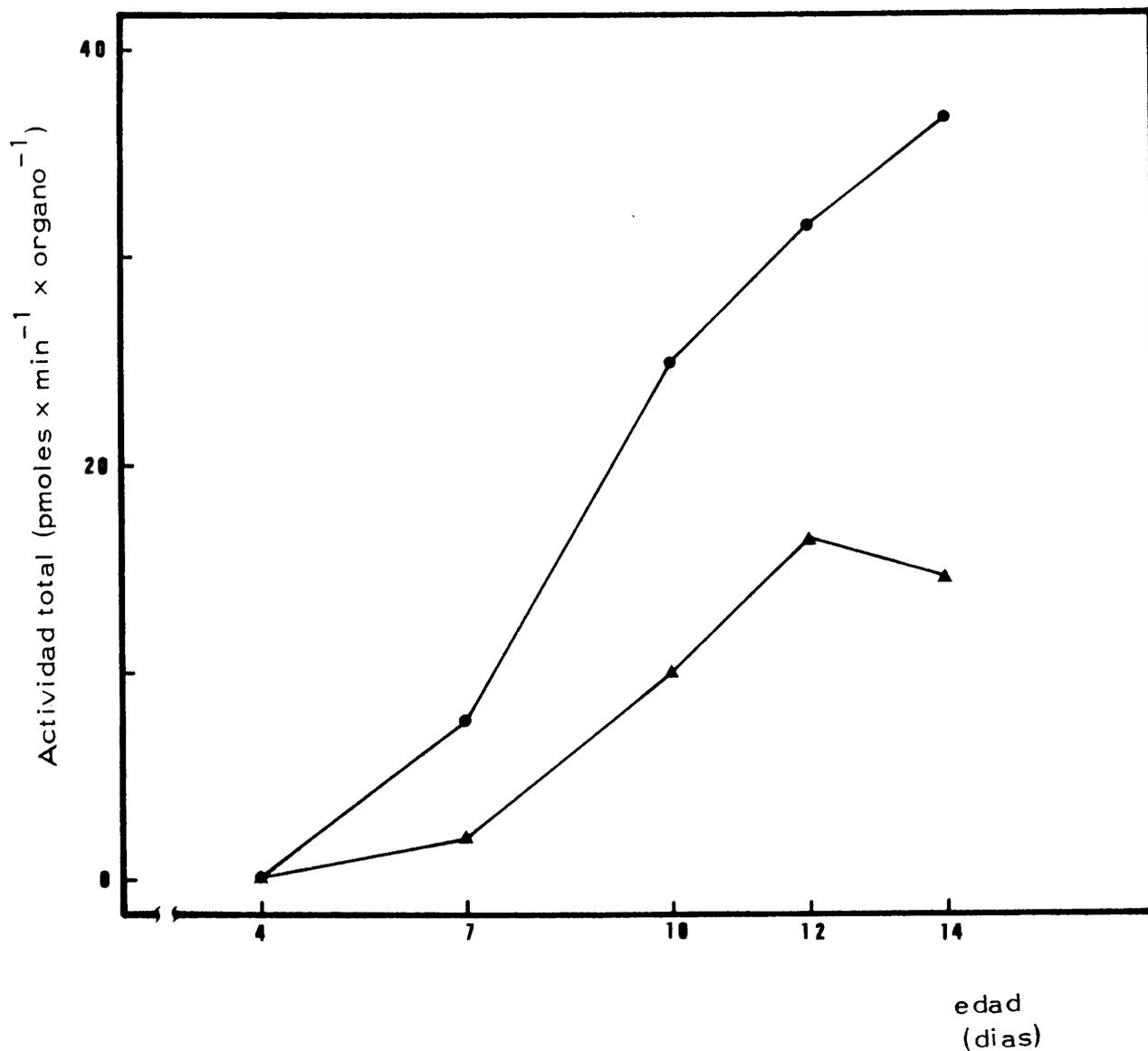


Fig. 12.- Actividad total de la HMG-Coa reductasa hepática en el cenit (●) y en el nadir (▲) de su actividad diurna durante las dos primeras semanas de vida. Datos tomados de la tabla 13

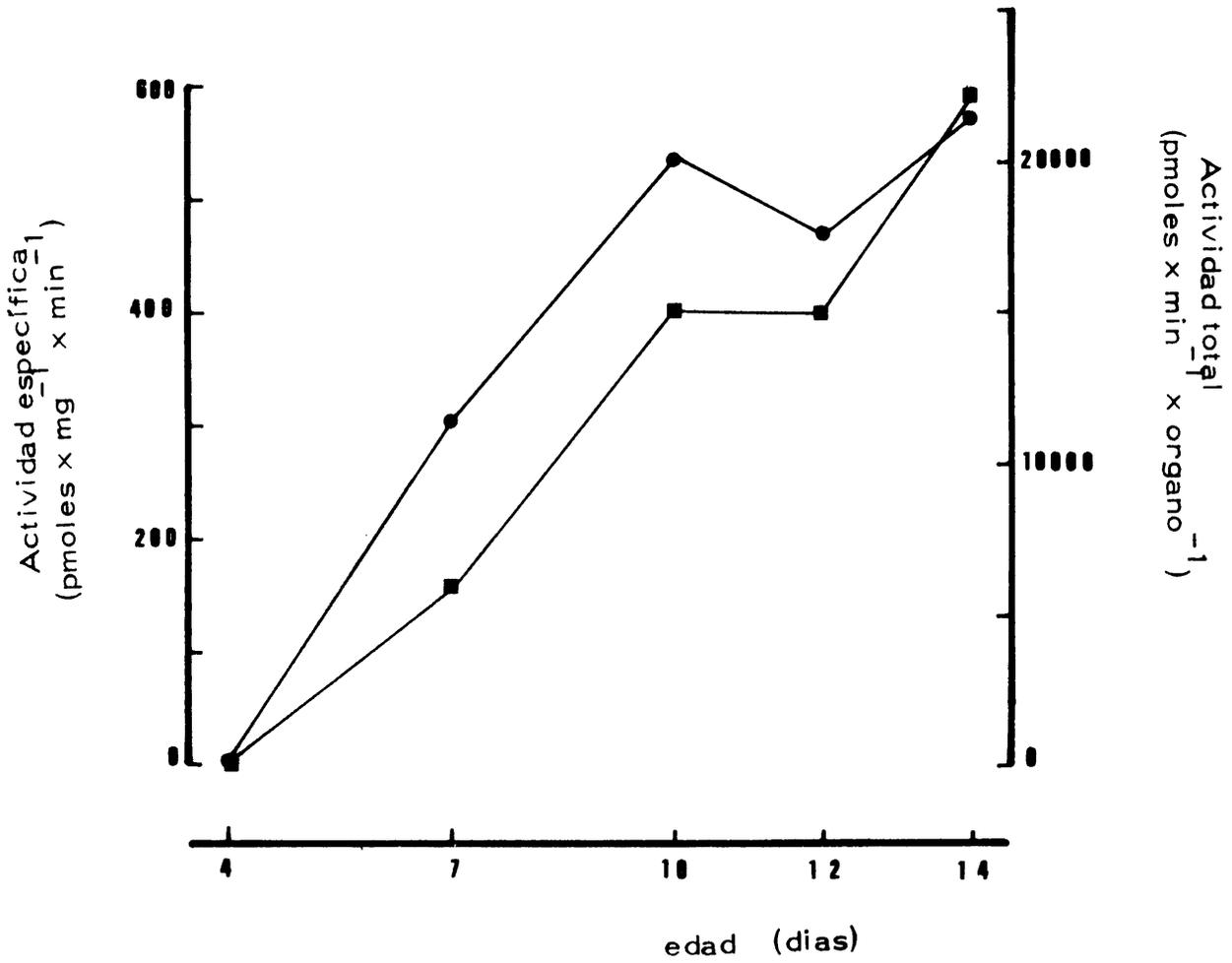


Fig. 13.- Evolución de las amplitudes de los ritmos diurnos de actividad específica (●) y total (■) durante las dos primeras semanas de vida. Datos tomados de las tablas 11 y 13

específica es en el día catorce 49,3 veces la del día cuatro, la actividad total del hígado es 88,7 veces mayor.

Dada la dificultad que entraña establecer los límites precisos del tracto duodenal no se pudo llevar a cabo el estudio paralelo de su contribución. Sí se hizo sin embargo, en el caso del cerebro a título comparativo, pese a la ausencia de ritmo diurno en este órgano. Como puede observarse en la tabla 14, su contribución es constante y marcadamente inferior a la del hígado a partir del cuarto día de edad.

4.2.2. - Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta sobre los cambios de actividad diurna

El siguiente objetivo fue establecer el efecto del colesterol exógeno sobre la actividad diurna de la HMG-CoA reductasa. Con esta finalidad se alimentó un lote de animales con dieta estandar a la que se había suplementado colesterol al 5 %. El tratamiento se administró a partir del comienzo de la fase luminosa del onceavo día después de la eclosión. Hasta ese momento los animales habían sido alimentados con la dieta habitual. Durante dos ciclos consecutivos se determinaron las actividades en hígado y cerebro tanto de pollos tratados como de pollos controles en los que no se había introducido ningún cambio de alimentación.

4.2.2.1. - Influencia en hígado

Los resultados obtenidos para el hígado se recogen en la

TABLA 14

Actividad total de la HMG-CoA reductasa cerebral durante las dos primeras semanas de vida, referidas al peso medio de órgano encontrado para cada edad y calculadas a partir de los datos de la cuarta columna que expresan el promedio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Edad (días)	Peso medio Órgano(g)	Prot. micros (mg x g org ⁻¹)	Act. esp. (pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	Act. total (pmoles x min ⁻¹)
4	0.99 \pm 0.01	2.09	332.4 \pm 8.8	687.7
7	1.17 \pm 0.02	2.02	326.1 \pm 3.9	770.7
10	1.24 \pm 0.02	2.09	296.5 \pm 49.5	768.4
14	1.39 \pm 0.01	1.68	311.0 \pm 24.4	726.2

tabla 15. De la comparación con pollos controles, alimentados con dieta estandar (fig. 14) se desprende que, a partir de las tres horas de tratamiento, la actividad desciende bruscamente, alcanzando en el nadir tan solo el 7.9 % de la actividad control y que, durante el segundo día, se esboza una ligera variación diurna que se mantiene, en todo caso, por debajo del 20 % de la actividad de los controles.

4. 2. 2. 2. - Influencia en duodeno

En asa duodenal (tabla 16), el colesterol de la dieta posee, al igual que en hígado, un potente efecto inhibitor de la HMG-CoA reductasa, si bien se pone de manifiesto antes que en aquel órgano, de tal modo que a las tres horas de tratamiento se alcanza ya un 36% de la actividad control. No obstante, durante el primer día se apunta aún un pequeño máximo de actividad que coincide con el cenit control aunque de magnitud considerablemente menor. Los niveles de nadir aparecen igualmente disminuidos y, como puede apreciarse en la fig. 15 durante el segundo día persiste un cenit residual que constituye, aproximadamente, el 30 % de la actividad control a la misma hora.

4. 2. 2. 3. - Influencia en cerebro

Los datos recabados en cerebro (tabla 17) ponen claramente de relieve que el colesterol exógeno no posee ningún efecto sobre la actividad HMG-Coa reductasa de este órgano, al menos durante las primeras 48 horas del tratamiento. Este hecho queda ilustrado gráficamente en la

TABLA 15

Efecto del ayuno y de una dieta suplementada con colesterol al 5 % sobre la evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa hepática en pollos de 11 días de edad, Se indica, en cada caso, a la hora en que fueron sacrificados los animales así como el tiempo de exposición a la luz o a la oscuridad en ese momento. Asimismo se indica el tiempo de tratamiento en horas. Las actividades específicas se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Hora del día	Ciclo de iluminación tiempo exposición	Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)		Horas de tratamiento
		Controles	Ayuno	
08:00	11	556.2 \pm 36.8	-----	0
11:00	2	876.5 \pm 47.8	974.5 \pm 35.8	3
14:00	5	990.3 \pm 96.9	565.7 \pm 33.0	6
16:00	7	1360.3 \pm 74.4	590.9 \pm 79.9	8
23:00	2	526.4 \pm 40.3	41.8 \pm 1.7	15
08:00	11	591.0 \pm 32.3	40.2 \pm 2.7	24
11:00	2	870.7 \pm 55.3	171.6 \pm 10.5	27
14:00	5	1220.1 \pm 114.5	-----	30
16:00	7	1498.0 \pm 66.7	219.2 \pm 14.3	32
23:00	2	530.2 \pm 75.7	38.1 \pm 7.2	39

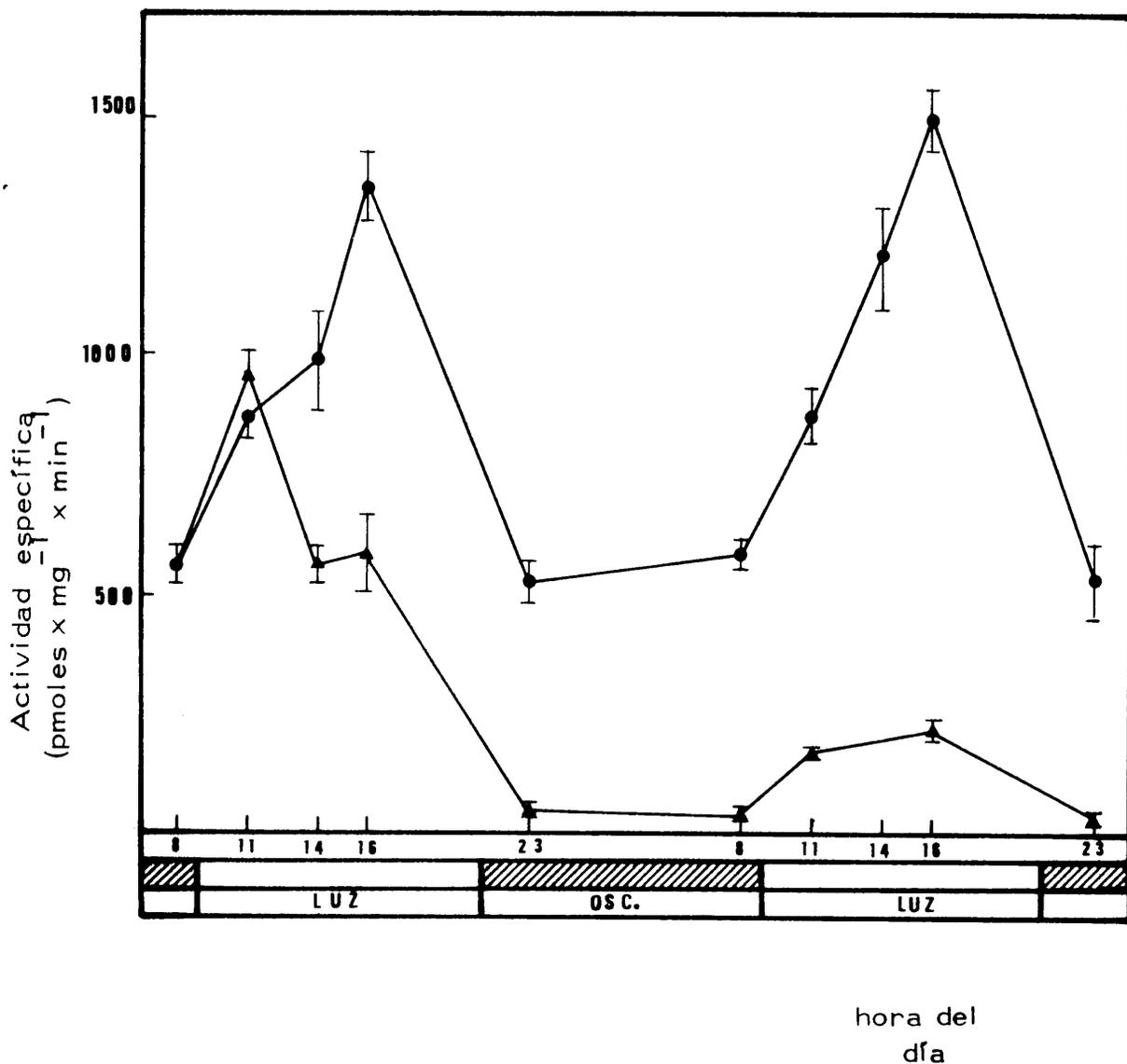


Fig. 14. - Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa hepática en pollos de 11 días. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

TABLA 16

Efecto del ayuno y de una dieta suplementada con colesterol al 5% sobre la evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa duodenal en pollos de 11 días de edad. Se indica, en cada caso, a la hora en que fueron sacrificados los animales así como el tiempo de exposición a la luz o a la oscuridad en ese momento. Asimismo se indica el tiempo de tratamiento en horas. Las actividades específicas se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación		Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)			Horas de tratamiento
Hora del día	tiempo de exposición	Controles	Dieta + colest.	Ayuno	
08:00	11	197.3 \pm 7.2	-----	-----	0
11:00	2	231.2 \pm 7.3	83.3 \pm 2.0	157.6 \pm 1.4	3
14:00	5	-----	87.2 \pm 6.2	62.5 \pm 2.0	6
16:00	7	291.2 \pm 4.3	130.8 \pm 11.0	47.0 \pm 1.1	8
23:00	2	84.2 \pm 4.2	30.5 \pm 0.9	26.7 \pm 1.0	15
08:00	11	125.7 \pm 5.7	20.5 \pm 0.3	34.8 \pm 2.2	24
11:00	2	134.1 \pm 3.5	29.3 \pm 1.3	32.2 \pm 1.6	27
14:00	5	-----	40.8 \pm 2.9	21.5 \pm 0.9	30
16:00	7	242.5 \pm 12.6	72.4 \pm 4.4	51.2 \pm 1.0	32
23:00	2	80.8 \pm 3.7	31.3 \pm 0.4	27.1 \pm 1.6	39

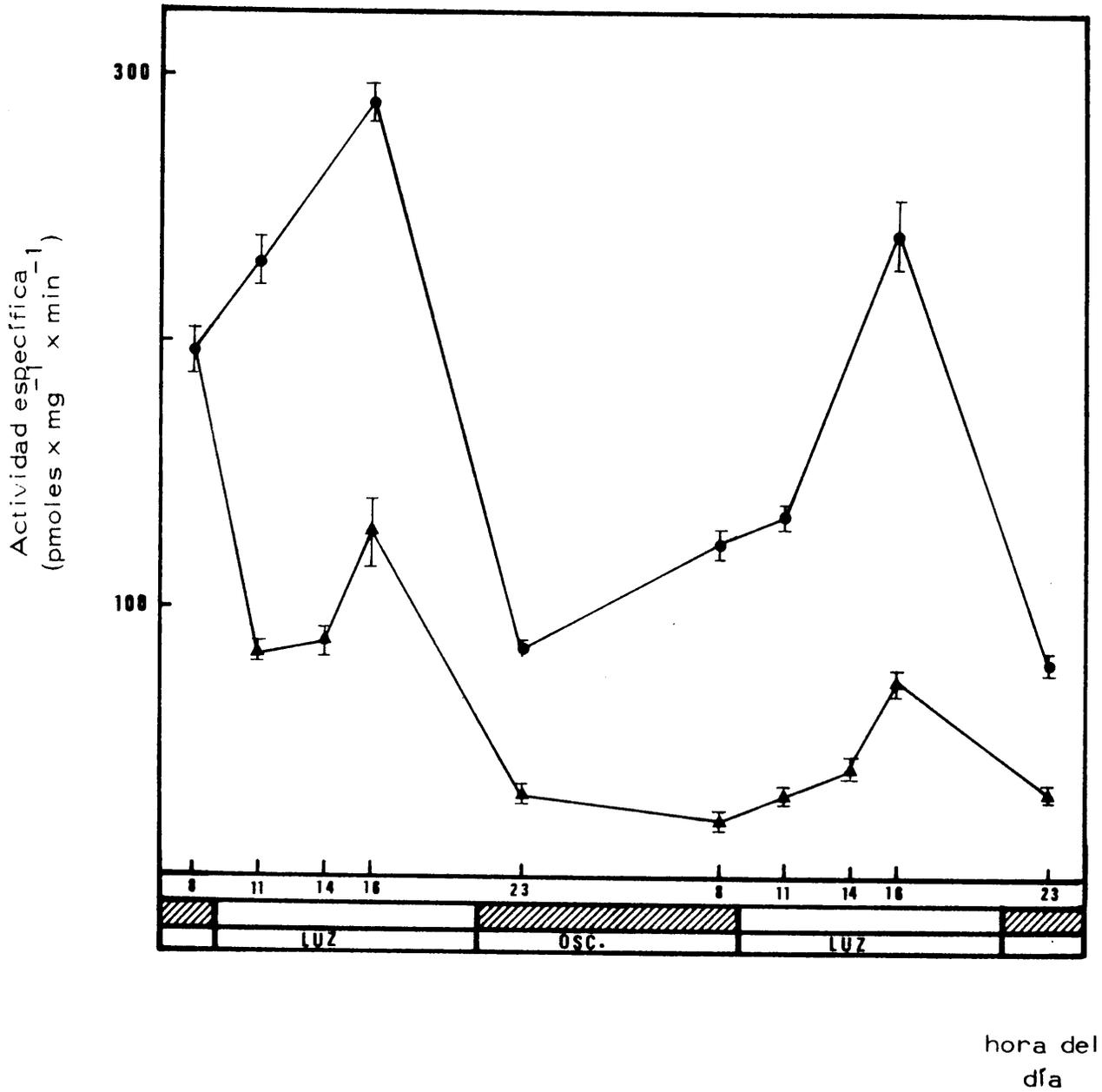


Fig. 15.- Influencia de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa duodenal en pollos de 11 días. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

TABLA 17

Efecto del ayuno y de una dieta suplementada con colesterol al 5 % sobre la evolución diurna de la actividad HMG-CoA reductasa cerebral en pollos de 11 días de edad. Se indica, en cada caso, a la hora en que fueron sacrificados los animales así como el tiempo de exposición a la luz o a la oscuridad en ese momento. Asimismo se indica el tiempo de tratamiento en horas. Las actividades específicas se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación		Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)			Horas de tratamiento
Hora del día	tiempo de exposición	Controles	Dieta + colest.	Ayuno	
08:00	11	515.0 \pm 35.8	-----	-----	0
11:00	2	535.6 \pm 16.6	557.5 \pm 9.8	418.9 \pm 11.8	3
14:00	5	469.5 \pm 32.8	458.1 \pm 5.8	373.3 \pm 27.9	6
16:00	7	574.9 \pm 64.8	-----	545.5 \pm 50.3	8
23.00	2	463.5 \pm 50.2	534.8 \pm 35.1	505.5 \pm 25.9	15
08:00	11	466.7 \pm 21.5	-----	392.3 \pm 19.6	24
11:00	2	520.9 \pm 18.5	469.9 \pm 31.9	445.0 \pm 8.7	27
14:00	5	-----	575.6 \pm 11.7	599.3 \pm 44.7	30
16:00	7	420.5 \pm 22.1	477.1 \pm 27.4	533.5 \pm 39.9	32
23:00	2	470.0 \pm 36.2	530.2 \pm 28.9	510.9 \pm 22.1	39

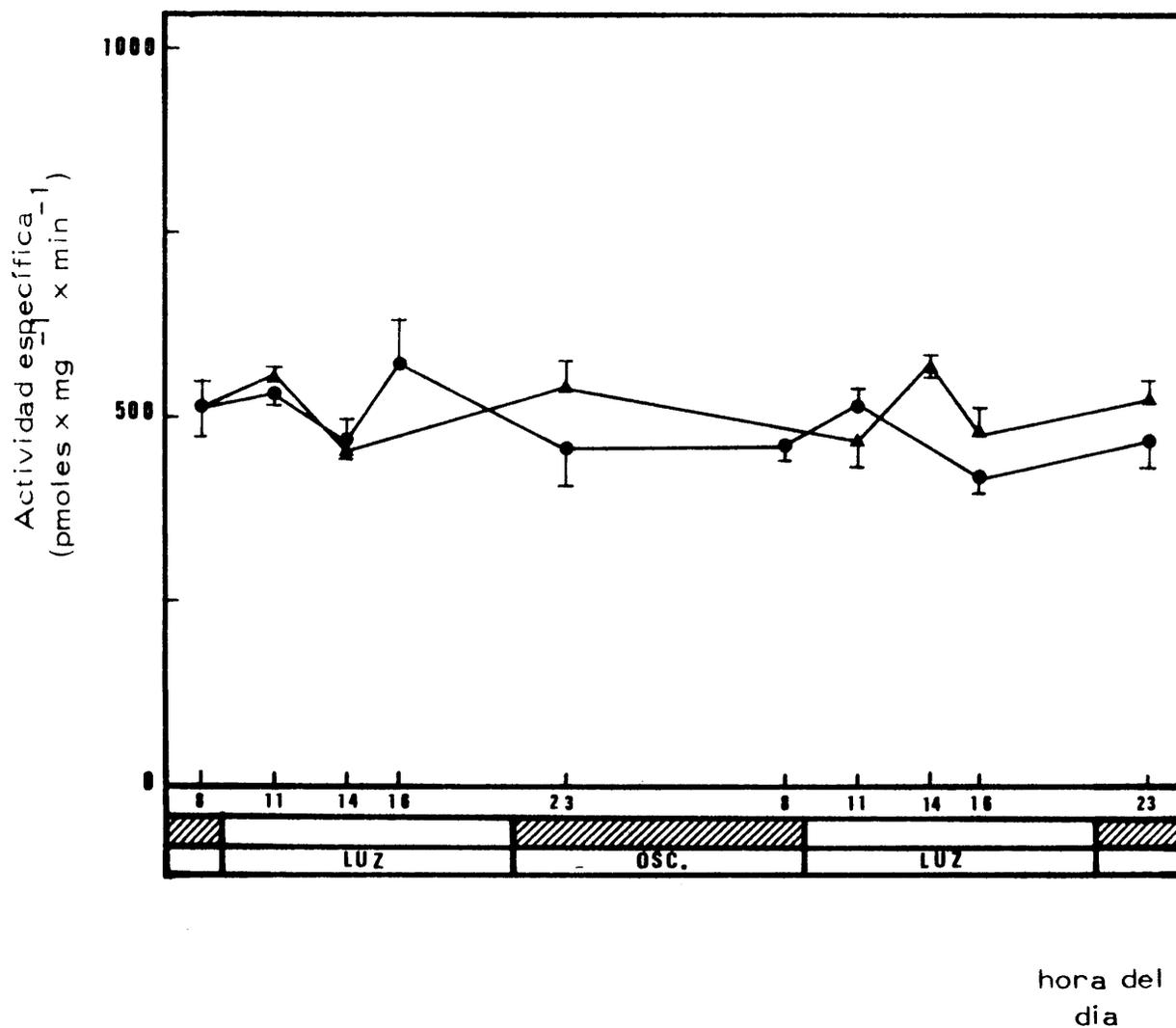


Fig. 16.- Efecto de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa cerebral en pollos de 11 días. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

fig. 16 en la que no se aprecian diferencias significativas entre los animales controles y los tratados.

4. 2. 2. 4. - Influencia sobre las variaciones diurnas a lo largo del desarrollo postnatal

De forma paralela a como se hizo con los animales alimentados con dieta estandar se creyó conveniente estudiar ahora la influencia de una dieta rica en colesterol sobre la propia aparición del ritmo durante la primera semana de vida. Con este objeto se sometió un grupo de animales a una dieta suplementada con colesterol al 2 % desde el momento de la eclosión, registrándose sucesivamente en el cenit y en el nadir, las actividades hepáticas y duodenal durante los 14 primeros días. Los resultados obtenidos para ambos órganos se han resumido en las tabla 18 y 19, respectivamente. Como puede verse el colesterol exógeno administrado en la dieta no solamente suprime los incrementos de actividades que tienen lugar normalmente en hígado y duodeno a partir del día 4, sino que anula, asimismo, el ritmo diurno en ambos órganos.

4. 2. 3. - Influencia del ayuno sobre los cambios de actividad diurna

A continuación se procedió a estudiar, de manera análoga, la respuesta al ayuno en los tres órganos mencionados. La privación de alimento se llevó a cabo igualmente al comienzo de la fase luminosa del onceavo día después de la eclosión. Durante 48 horas consecutivas se registró la actividad HMG-CoA reductasa en hígado, asa duodenal y cerebro,

TABLA 18

Efecto de una dieta suplementada con colesterol al 2 % sobre la amplitud del ritmo diurno de actividad hepática durante las dos primeras semanas de vida. Las actividades se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Edad (días)	Actividad específica (pmoles \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹)		Amplitud
	Nadir	Cenit	
4	21.9 \pm 2.9	19.6 \pm 3.1	--
7	21.9 \pm 2.0	48.0 \pm 8.8	26.6
9	51.9 \pm 21.9	43.9 \pm 4.9	--
11	70.3 \pm 14.5	41.3 \pm 5.7	--
14	21.2 \pm 0.2	27.2 \pm 0.4	6.0

TABLA 19

Efecto de una dieta suplementada con colesterol al 2 % sobre la amplitud del ritmo diurno de actividad duodenal durante las dos primeras semanas de vida. Las actividades se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Edad (días)	Actividad específica (pmoles x mg ⁻¹ x min ⁻¹)		
	Nadir	Cenit	Amplitud
4	31.4 \pm 5.3	21.9 \pm 0.9	--
7	27.1 \pm 1.6	38.8 \pm 0.5	11.7
9	25.0 \pm 3.4	26.3 \pm 2.2	1.3
11	33.0 \pm 4.3	38.0 \pm 12.6	5.0
14	14.1 \pm 0.2	17.7 \pm 0.4	3.6

tanto en animales ayunados como en animales controles alimentados normalmente.

4. 2. 3. 1. - Influencia en hígado

Como se deduce de los resultados contenidos en la tabla 15 la actividad hepática en animales ayunados mostró una evolución similar a la causada por la dieta rica en colesterol, aunque la respuesta, en este caso fue inmediata. Según puede verse en la fig. 17, la actividad a las tres horas de la retirada de alimento descendió ya a un 65 % y continuó haciéndolo hasta la mitad del periodo luminoso, estabilizándose entonces en unos niveles superiores a los alcanzados en el caso de la dieta de colesterol, aunque por debajo del nadir correspondiente de los animales controles. Durante el segundo día la actividad mostró una ligera tendencia a aumentar, aunque puede considerarse que, al menos durante el periodo observado, el ritmo quedó prácticamente abolido como consecuencia del ayuno.

4. 2. 3. 2. - Influencia en duodeno

La respuesta de la reductasa duodenal ante esta nueva situación fue igualmente de inhibición acentuada, ya desde el primer momento (tabla 16). Como se aprecia en la fig. 18 el ritmo queda, también en este caso, prácticamente abolido durante las 48 horas siguientes a la privación de alimento.

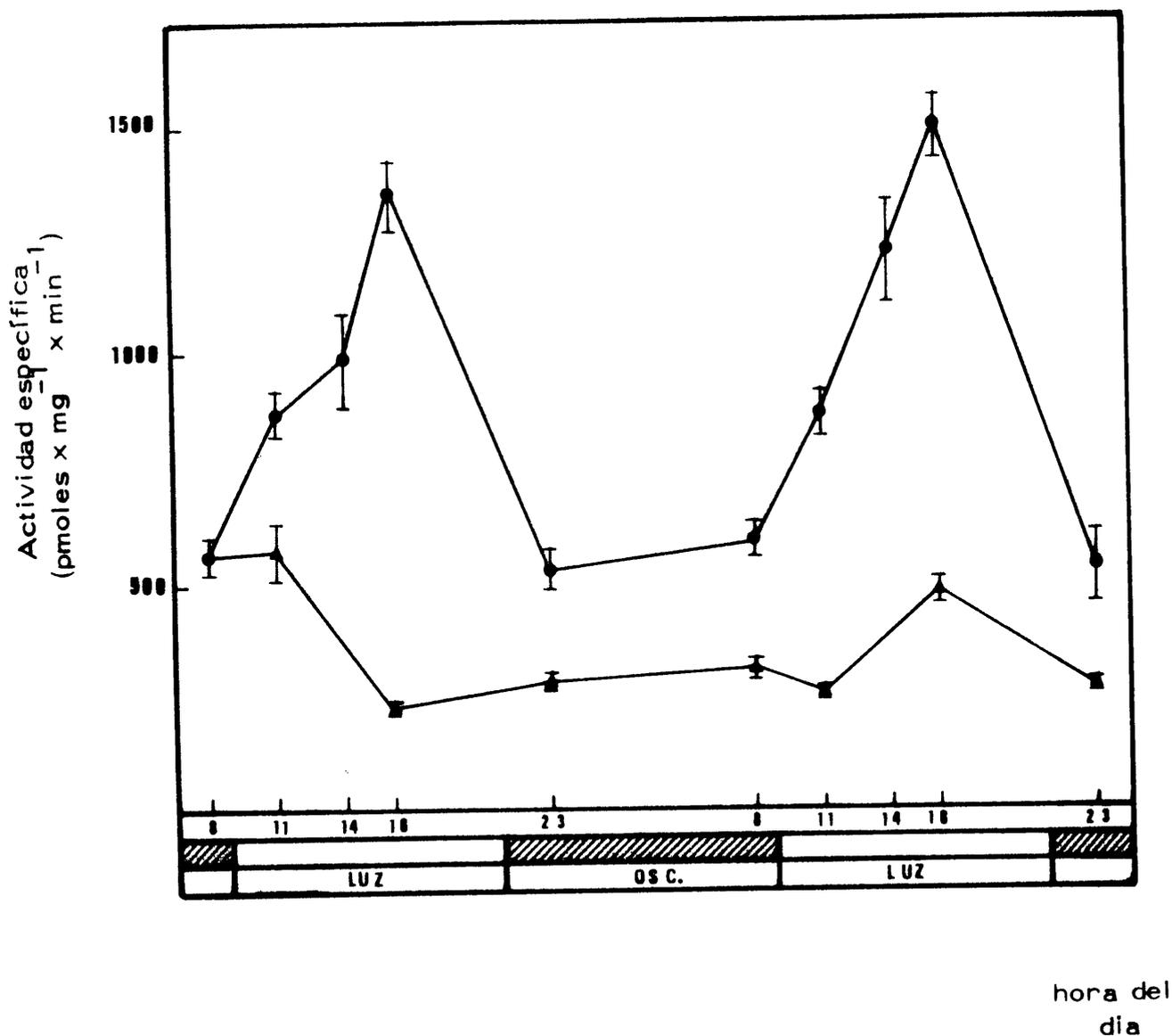


Fig. 17.- Influencia del ayuno sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa hepática en pollos de 11 días. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

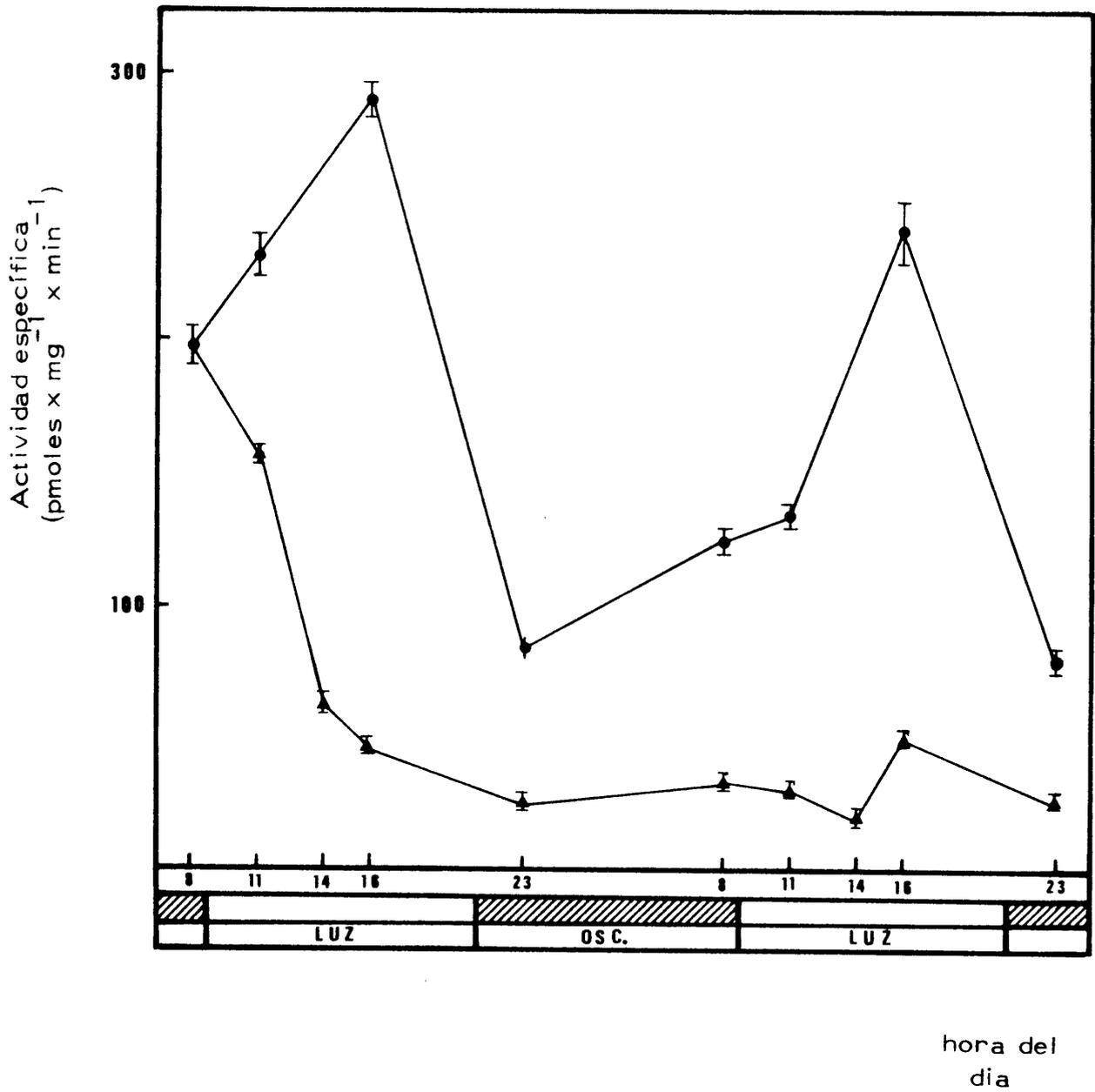


Fig. 18.- Efecto del ayuno sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa duodenal en pollos de 11 días. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

4. 2. 3. 3. - Influencia en cerebro

La ausencia de respuesta de la HMG-CoA reductasa sigue siendo la característica más notable en el caso del cerebro (tabla 17). La fig. 19 muestra la estrecha correlación existente entre las actividades controles y las procedentes de animales ayunados.



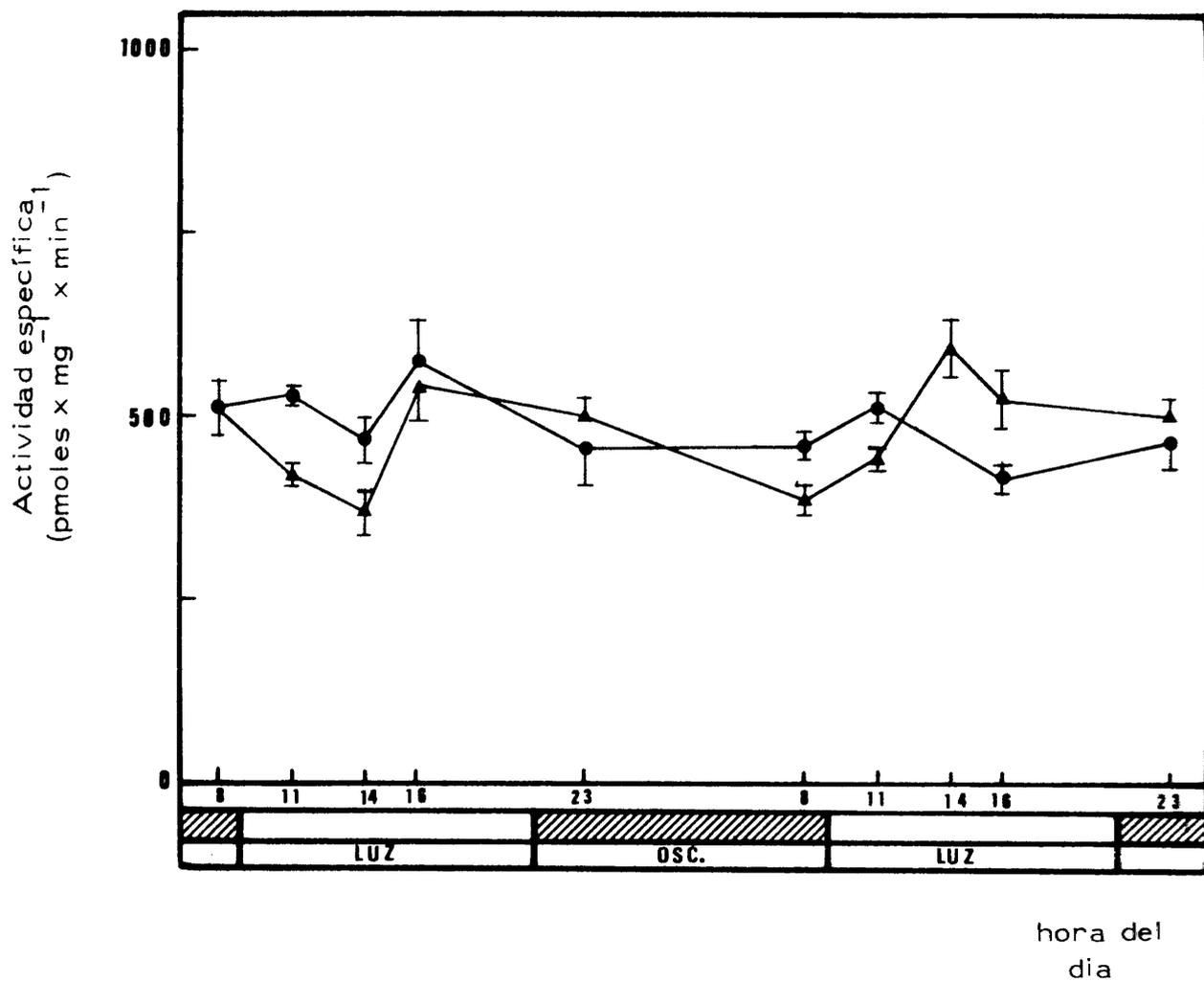


Fig. 19.- Influencia del ayuno sobre la evolución diurna de la HMG-CoA reductasa cerebral en pollos de 11 días (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

4. 3. - VARIACIONES DIURNAS DE LA INCORPORACION DE ^{14}C - ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES. INFLUENCIA DE LA ALIMENTACION

En las experiencias descritas a continuación se han hecho determinaciones sistemáticas de incorporación de ^{14}C - acetato a lípidos insaponificables (estimador frecuentemente utilizado de la velocidad de la ruta biosintética del colesterol), bajo situaciones análogas a las utilizadas para la HMG-CoA reductasa: animales alimentados con dieta estandar, alimentados con dieta rica en colesterol y ayunados.

4. 3. 1. - Cambios de la radiactividad incorporada en animales alimentados con dieta estandar

Para poder confrontar los valores de actividad diurna de la HMG-CoA reductasa hepática y duodenal se llevaron a cabo, durante un ciclo completo, incorporaciones de ^{14}C acetato sobre ambos órganos, en pollos de 11 días alimentados con dieta equilibrada estandar hasta el momento del sacrificio. Las incorporaciones se realizaron sobre cortes finos de hígado y fragmentos de asa duodenal, según el procedimiento descrito en el apartado 3. 2. 2.

Las pruebas preliminares de incorporación llevadas a cabo en cerebro no fueron satisfactorias. Es posible que, dadas las características estructurales del tejido, la preparación de cortes finos acarree una gran

destrucción celular, hecho que podría explicar la escasa reproductividad de los datos obtenidos. Por esta razón se abandonó el estudio paralelo de incorporación de acetato en este órgano.

4.3.1.1. - Cambios en hígado

Los resultados obtenidos en hígado (tabla 20), manifiestan la existencia de un ritmo diurno de incorporación cuyo cenit se encuentra hacia la mitad del periodo luminoso y es 8.93 veces mayor que el nadir, situado hacia el final de la fase oscura.

4.3.1.2. - Cambios en duodeno

También se han encontrado variaciones diurnas en la incorporación de ^{14}C - acetato por fragmentos de asa duodenal (tabla 21). La máxima velocidad de incorporación tiene lugar hacia la mitad de periodo luminoso y es 2.18 veces superior a la mínima registrada.

4.3.2. - Efecto del colesterol suplementado a la dieta.

Animales de 11 días alimentados hasta entonces normalmente, se sometieron desde el comienzo de la fase luminosa a una dieta estandar suplementada con colesterol al 5 %. Periódicamente y durante las 48 horas siguientes se determinaba la velocidad de incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en cortes de hígado y fragmentos del tracto

TABLA 20

Evolución diurna de la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en cortes delgados de hígado de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación y la hora a la que fueron sacrificados los animales. Las velocidades de incorporación se expresan como medias de cuatro valores \pm S. E. M.

<u>Ciclo de iluminación</u>			
Hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles \times g $^{-1}$ \times h $^{-1}$)
08:00	11		1.585 \pm 0.082
11:00	2		5.474 \pm 1.073
16:00	7		14.161 \pm 1.440
23:00	2		4.924 \pm 0.213

TABLA 21

Evolución diurna de la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en fragmentos de asa duodenal de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación y la hora a la que fueron sacrificados los animales. Las velocidades de incorporación se expresan como medias de cuatro valores \pm S. E. M.

<u>Ciclo de iluminación</u>			
hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles \times g $^{-1}$ \times h $^{-1}$)
08:00	11		0.753 \pm 0.092
11:00	2		0.998 \pm 0.174
16.00	7		1.285 \pm 0.162
23:00	2		0.596 \pm 0.030

duodenal. Los resultados obtenidos son los siguientes:

4.3.2.1. - Efecto en hígado

El efecto de la dieta rica en colesterol sobre la incorporación de acetato en hígado se recoge en la tabla 22. En la fig. 20 se presentan estos valores junto a los correspondientes controles. Se observa una drástica supresión de las variaciones diurnas que afecta tanto al cenit como al nadir, de tal modo que a las 8 horas de tratamiento la velocidad de incorporación fue del 14 % respecto a los controles y a las 15 horas, del orden del 20 %.

4.3.2.2. - Efecto en duodeno

La influencia del colesterol de la dieta sobre la incorporación en duodeno es igualmente rápida aunque menos acusada. Como puede verse en la fig. 21 y en los datos de la tabla 23 durante ambos ciclos persiste un ritmo disminuido de incorporación cuyos valores se mantienen para casi todos los puntos entre el 50 y el 75 % de los valores controles, pero cuya amplitud permanece prácticamente intacta.

4.3.3. - Efecto del ayuno

Finalmente se ha determinado la velocidad de incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en cortes de hígado y en duodeno

TABLA 22

Influencia de la dieta suplementada con colesterol al 5 % sobre la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en cortes de hígado de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación así como la hora a la que fueron sacrificados los animales, y el tiempo de tratamiento. Las velocidades de incorporación se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

<u>Ciclo de iluminación</u>				
hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles \times g $^{-1}$ \times h $^{-1}$)	hora de tratamiento
08:00	11		1.585 \pm 0.082	0
11:00	2		1.316 \pm 0.100	3
16:00	7		2.924 \pm 0.363	8
23:00	2		0.720 \pm 0.108	15
08:00	11		0.215 \pm 0.031	24
11:00	2		1.652 \pm 0.073	27
16.00	7		1.362 \pm 0.315	32
23:00	2		0.050 \pm 0.002	39

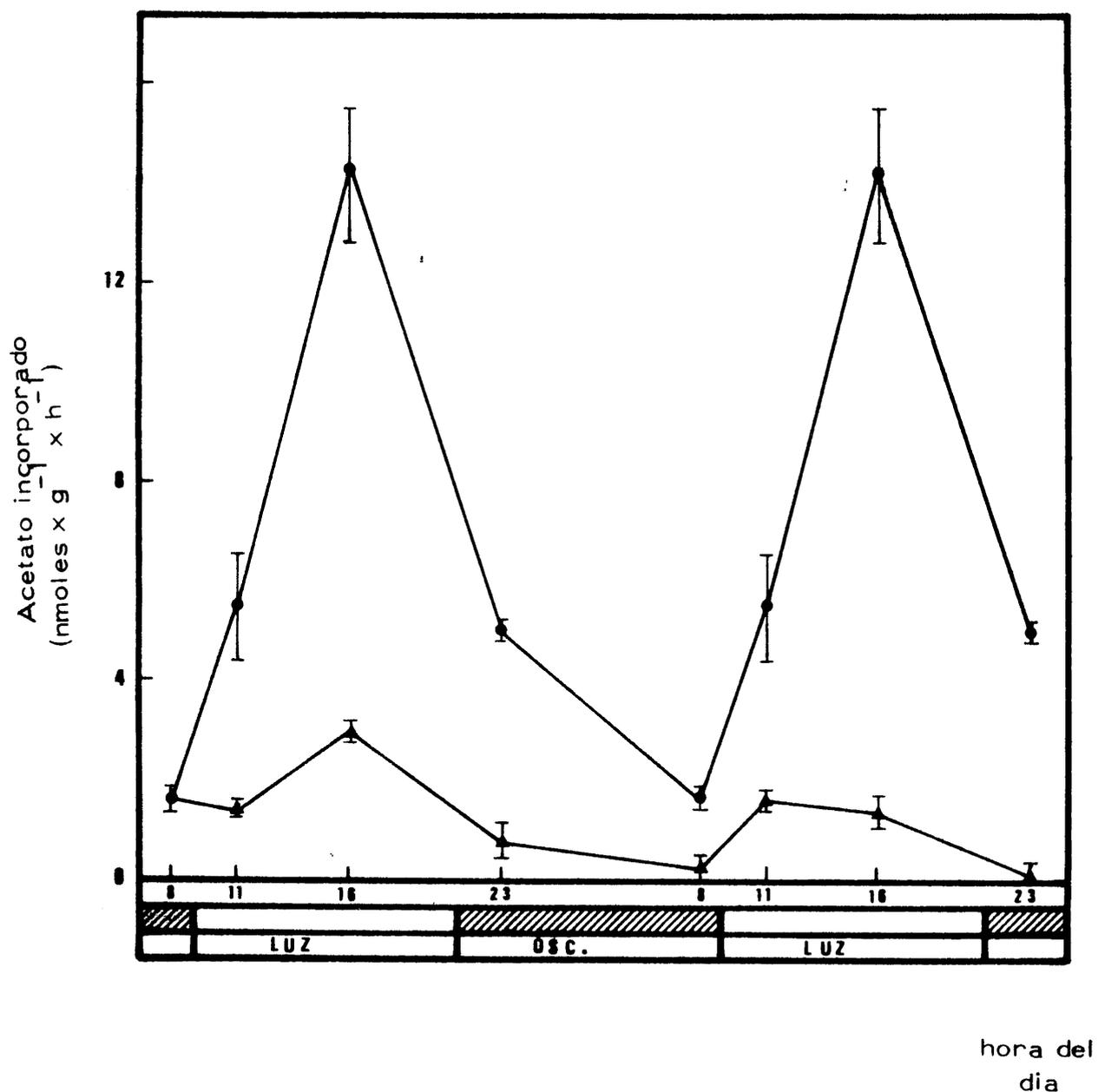


Fig. 20.- Influencia de la dieta sobre la velocidad de incorporación de ¹⁴C-acetato a lípidos insaponificables por cortes de hígado. Pollos de 11 días de edad. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones ± S. E. M.

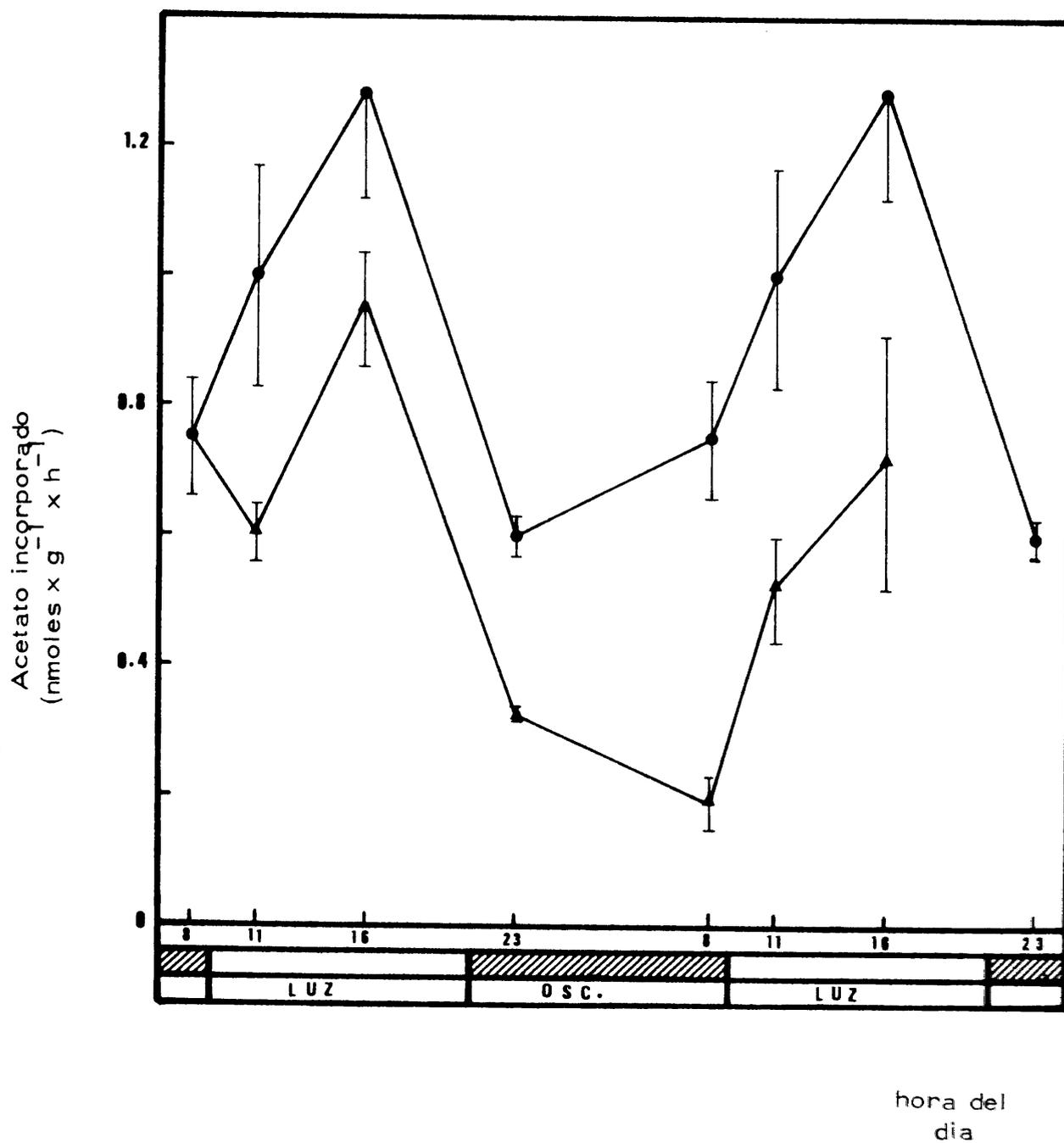


Fig. 21.- Efecto de la dieta sobre la velocidad de incorporación de ¹⁴C-acetato a lípidos insaponificables por fragmentos de asa duodenal. Pollos de 11 días de edad (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones ± S. E. M.

TABLA 23

Influencia de la dieta suplementada con colesterol al 5 % sobre la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en fragmentos de asa duodenal de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación así como la hora a la que fueron sacrificados los animales, y el tiempo de tratamiento. Las velocidades de incorporación se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación				
hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles $\text{c g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	hora de tratamiento
08:00	11		0.753 ± 0.092	0
11:00	2		0.601 ± 0.041	3
16:00	7		0.956 ± 0.089	8
23:00	2		0.318 ± 0.004	15
08:00	11		0.191 ± 0.033	24
11:00	2		0.519 ± 0.087	27
16:00	7		0.718 ± 0.197	32

de pollos ayunados, durante las 48 horas posteriores a la privación de alimento. Esencialmente el diseño experimental fue el mismo que se describe en el apartado 4. 2. 3. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los dos órganos.

4. 3. 3. 1. - Efecto en hígado

La incorporación por cortes de hígado, en pollos ayunados muestra , durante el periodo registrado, un comportamiento idéntico al detectado para este órgano en el caso de la dieta rica en colesterol (tabla 24) La prontitud de la respuesta, la supresión total de ritmo y el mantenimiento de unos niveles constantemente inferiores a los mínimos controles son los rasgos más características de este efecto (fig. 22),

4. 3. 3. 2. - Efecto en duodeno

Los datos sumarizados en la tabla 25 así como la curva correspondiente de la fig. 23 muestran que también en duodeno existe un gran paralelismo entre la respuesta al ayuno y la respuesta al colesterol de la dieta. Para pollos ayunados siguen persistiendo las variaciones diurnas, aunque muy disminuidas y, en general los valores son algo inferiores a los observados para el caso de la dieta.

TABLA 24

Influencia del ayuno sobre la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en cortes de hígado de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación así como la hora a la que fueron sacrificados los animales, y el tiempo de tratamiento. Las velocidades de incorporación se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

<u>Ciclo de iluminación</u>				
Hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles \times g $^{-1}$ \times h $^{-1}$)	hora de tratamiento
08:00	11		1.585 \pm 0.082	0
11:00	2		2.109 \pm 0.278	3
16:00	7		0.242 \pm 0.004	8
23:00	2		1.544 \pm 0.256	15
08.00	11		0.487 \pm 0.135	24
11:00	2		0.868 \pm 0.315	27
16:00	7		0.759 \pm 0.050	32
23:00	2		0.040 \pm 0.001	39

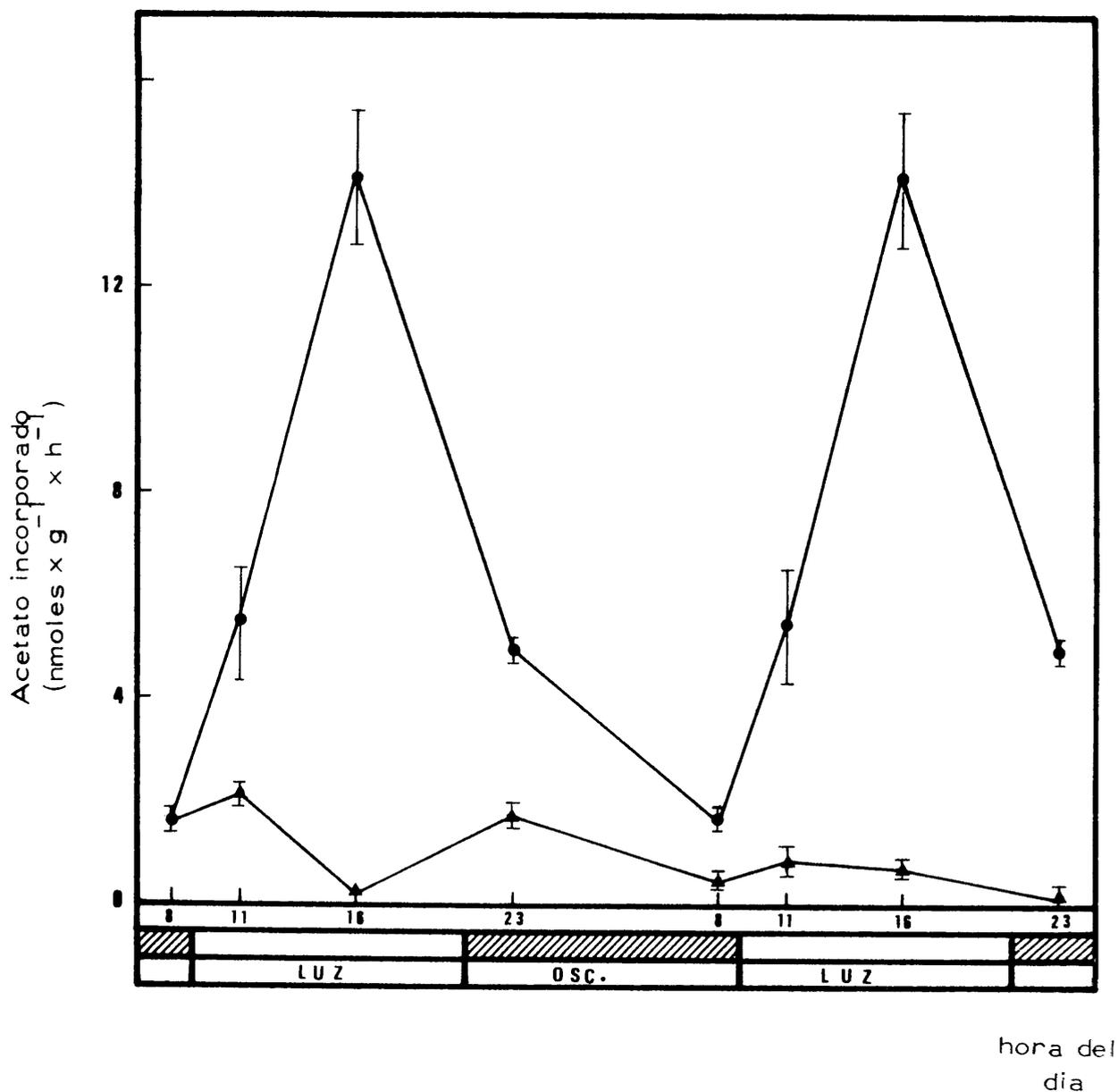


Fig. 22. - Efecto del ayuno sobre la velocidad de incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables por cortes de hígado. Pollos de 11 días de edad (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

TABLA 25

Influencia del ayuno sobre la incorporación de ^{14}C -acetato a lípidos insaponificables en fragmentos de asa duodenal de pollos de 11 días. Se indica el ciclo de iluminación así como la hora a la que fueron sacrificados los animales, y el tiempo de tratamiento. Las velocidades de incorporación se expresan como valores medios de cuatro determinaciones \pm S. E. M.

Ciclo de iluminación				
Hora del día	tiempo de exposición		Acetato incorporado (nmoles \times g $^{-1}$ \times h $^{-1}$)	hora de tratamiento
08:00	11		0.753 \pm 0.092	0
11:00	2		0.531 \pm 0.042	3
16:00	7		0.765 \pm 0.047	8
23:00	2		0.227 \pm 0.067	15
08:00	11		0.125 \pm 0.049	24
11:00	2		0.265 \pm 0.080	27
16:00	7		0.450 \pm 0.027	32

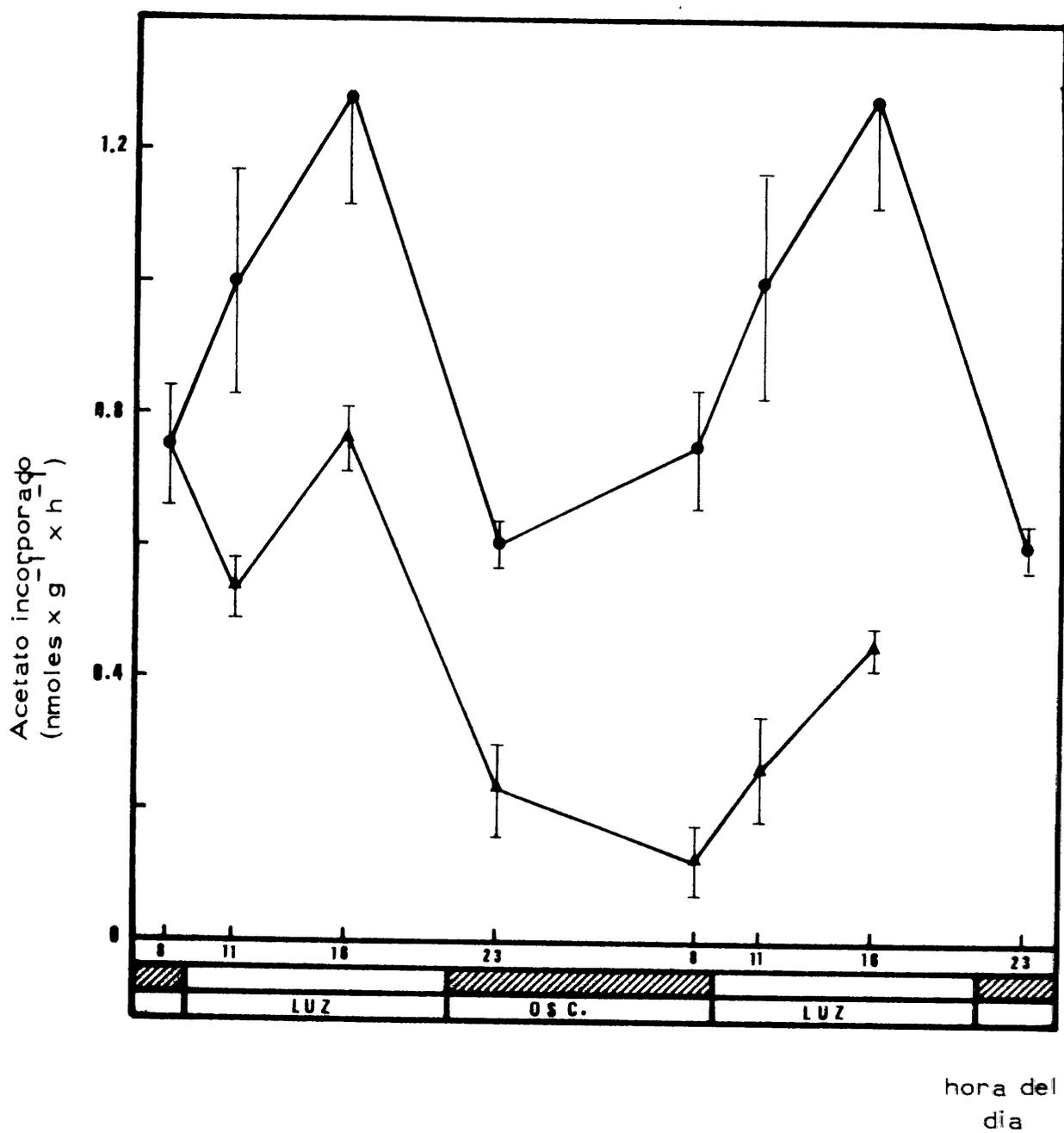


Fig. 23.- Efecto del ayuno sobre la velocidad de incorporación de ¹⁴C-acetato a lípidos insaponificables por fragmentos de asa duodenal. Pollos de 11 días de edad. (●) controles; (▲) tratados. Cada punto representa el valor medio de cuatro determinaciones ± S. E. M.

4. 4. - INFLUENCIA DEL AYUNO Y DE LA SUPLE-
MENTACION DE COLESTEROL EN LA DIETA
SOBRE LA COMPOSICION DE LAS MEMBRA-
NAS MICROSOMALES . EVOLUCION A LO
LARGO DEL DIA

La posibilidad de que, parte de la regulación de la biosíntesis del colesterol pueda interpretarse como el resultado de interacciones, más o menos específicas, entre las enzimas con carácter microsomal de la ruta, y más concretamente la HMG-CoA reductasa, y moléculas lipídicas de su entorno, nos ha llevado a considerar el estudio sistemático del contenido en colesterol y fosfolípidos de las membranas microsomales bajo el efecto, tanto del ayuno como de la dieta suplementada con colesterol al 5 %. Los resultados obtenidos para cada uno de los tres órganos estudiados, hígado, tracto duodenal y cerebro, se sintetizan a continuación:

4. 4. 1. - Microsomas del hígado

4. 4. 1. 1. - Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado

En la tabla 26 se han recogido los valores microsomales hepáticos de colesterol total, libre y esterificado medidos en pollos de 11 días. Los tratamientos se aplicaron de forma idéntica a la descrita en los apartados 4. 2. 2. y 4. 2. 3.

TABLA 26

Efecto del ayuno y de la suplementación de colesterol al 5% en la dieta sobre el contenido en colesterol total, libre y esterificado de microsomas hepáticos. Pollos con 11 días de edad. h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) ó a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; C. tot. = colesterol total; L = colesterol libre; E = colesterol esterificado; h. t. = Horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media; P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio control.

C. ilum.		Dieta estandar			Dieta + colesterol			Ayuno			h. t	
t. de	h.	C. tot.	L	E	C. tot.	L	E	C. tot.	L	E		
exp.		($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)		
08:00	11	▨	35.7	84.1	15.9	---	---	---	---	---	---	0
12:00	3	□	25.7	71.4	28.6	28.4	65.5	34.5	27.7	81.9	18.1	4
15:00	6	□	29.8	76.9	23.1	43.1	62.5	37.5	23.7	83.4	16.6	7
23:00	2	▨	27.0	73.7	26.3	47.5	63.2	36.8	32.2	83.4	16.6	15
08:00	11	▨	37.6	89.6	10.4	47.0	75.6	24.4	21.8	84.4	15.4	24
12:00	3	□	21.9	71.4	27.6	45.9	69.2	30.8	---	---	---	28
15:00	6	□	23.3	83.3	16.7	42.4	58.3	41.7	17.8	79.9	20.1	31
23:00	2	▨	37.9	83.3	16.7	56.2	65.0	35.0	30.4	81.9	18.1	39
$\bar{X} \pm S. E. M.$			29.9 + 2.3	79.2 + 2.4	20.7 + 2.3	44.4 + 3.2	65.6 + 2.1	34.4 + 2.1	25.6 + 2.2	82.5 + 0.6	17.5 + 0.6	
P					<0.01	<0.01	<0.01	<0.40	<0.40	<0.4		

En la fig. 24 se han representado los datos de colesterol total. No se aprecian, en ningún caso, variaciones diurnas de concentración; por el contrario, los valores son prácticamente constantes durante las 48 horas en que fueron observados. Las diferencias entre los valores medios no son estadísticamente significativas para los animales ayunados (tabla 26). En los animales tratados con la dieta de colesterol, la concentración microsomal media de colesterol total sufrió un incremento estadísticamente significativo, patente ya a las 7 horas de comenzar el tratamiento, que se estabilizó después, durante el periodo estudiado.

Los porcentajes de colesterol libre y esterificado, como puede apreciarse en la fig. 25, no mostraron variaciones correlacionadas con la hora del día. Esencialmente, los pollos ayunados tampoco presentaron diferencias significativas respecto a los controles, manteniéndose en ellos unos niveles del orden del 80 % para el libre y el 20 % para el esterificado. En los pollos tratados con dieta rica en colesterol, el porcentaje de colesterol libre se redujo significativamente hasta un 65 % a expensas del esterificado, que alcanzó así un 35 %, aproximadamente.

4. 4. 1. 2. - Variaciones del contenido en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, y fosfatidilinositol

Fosfolípidos totales. - Los niveles encontrados de fósforo lipídico total para microsomas hepáticos se muestran en la tabla 27 y se han representado graficamente en la fig. 26. En los animales controles el nivel de fósforo es prácticamente constante a cualquiera de las horas estudiadas, manteniéndose en torno a 8 μ g por mg de proteína. Los pollos alimentados con dieta rica

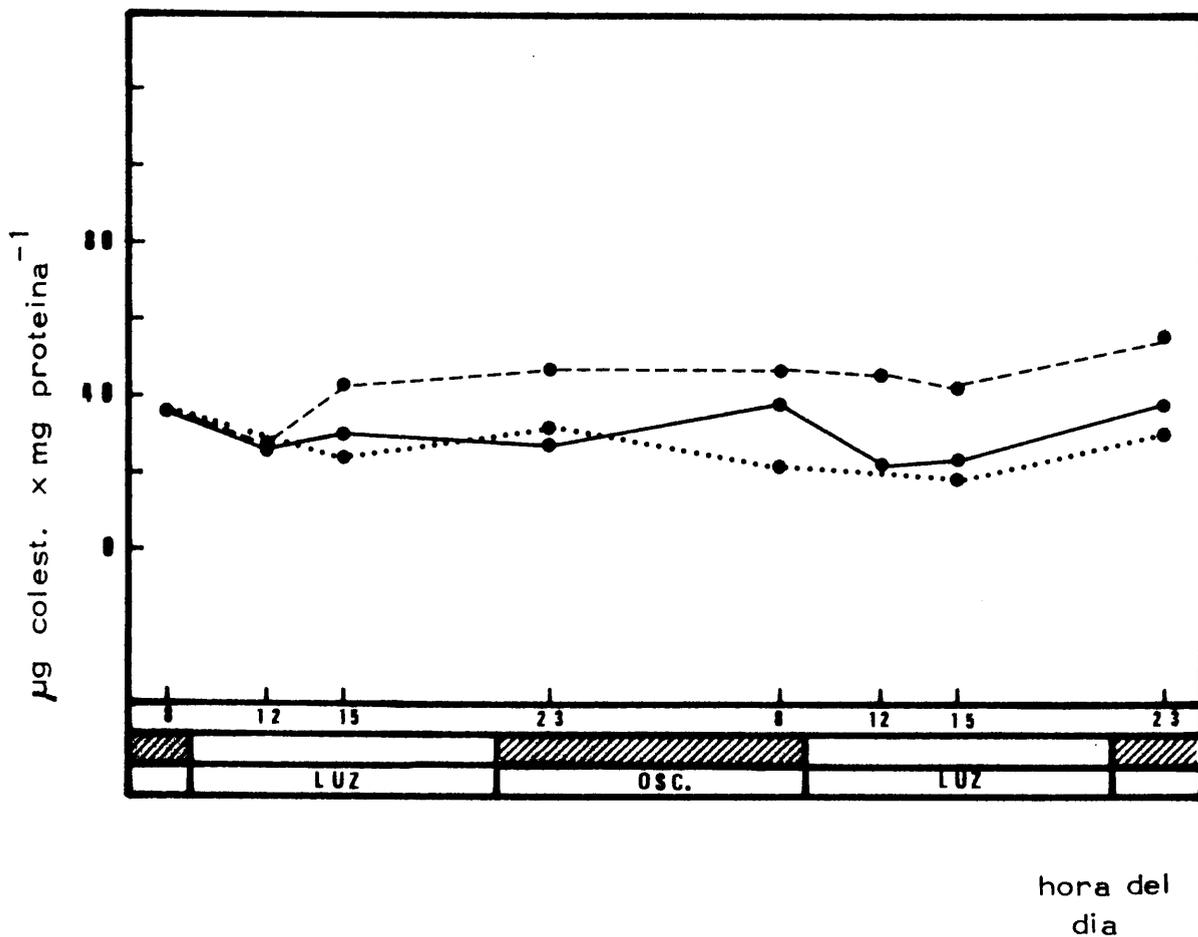


Fig. 24. - Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre el contenido en colesterol total de los microsomas hepáticos. (—) animales control; (---) animales alimentados con una dieta suplementada con colesterol al 5%; (····) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

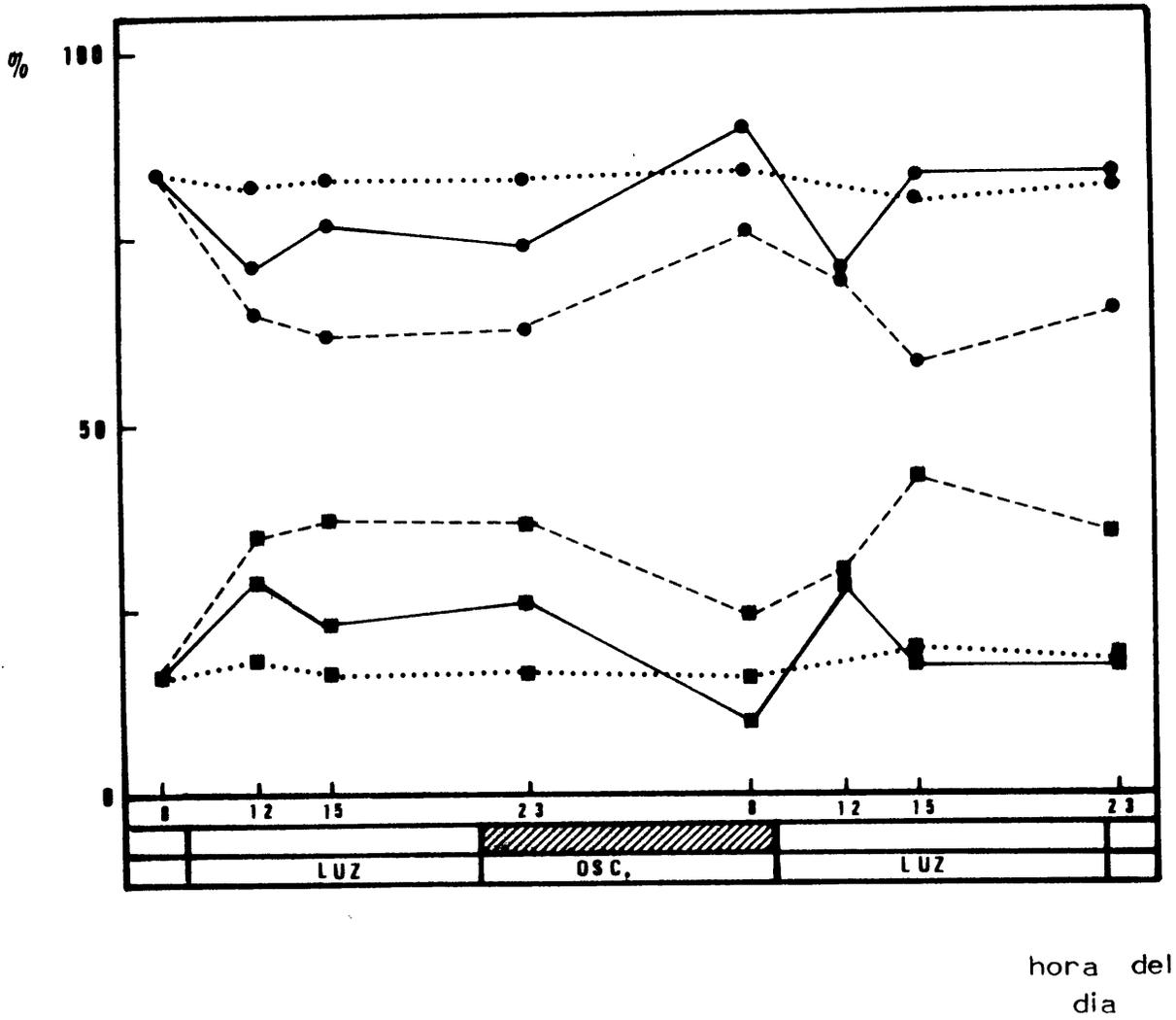


Fig. 25.- Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en colesterol libre (●) y esterificado (■) de los microsomas hepáticos. (—) animales controles; (---) animales alimentados con una dieta de colesterol al 5 %; (.....) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo

TABLA 27

Cambios en el contenido de fósforo lipídico total de microsomas hepáticos, inducidos por el ayuno y por una dieta de colesterol al 5%. Pollos de 11 días. C. ilumin. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h = hora trat. = horas de tratamiento. Los valores se han obtenido a partir de cinco animales. $\bar{X} \pm$ S. E. M. = valor promedio \pm error de la media; P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

C. ilumin.		Fósforo total ($\mu\text{g} \times \text{mg proteina}^{-1}$)			
H	tiempo de exposición	Dieta estandar	Dieta + colest.	Ayuno	hora trat.
08:00	11	9.1	--	--	0
12:00	3	8.0	3.7	8.8	4
15:00	6	9.0	4.5	8.7	7
23:00	2	9.0	6.7	11.4	15
08:00	11	8.3	6.0	8.6	24
12:00	3	7.7	4.6	--	28
15:00	6	5.3	4.4	6.7	31
23:00	2	9.0	6.7	11.0	39
$\bar{X} \pm$ S.E.M.		8.2 ± 0.4	5.2 ± 0.5	9.2 ± 0.7	
P			< 0.01	< 0.40	

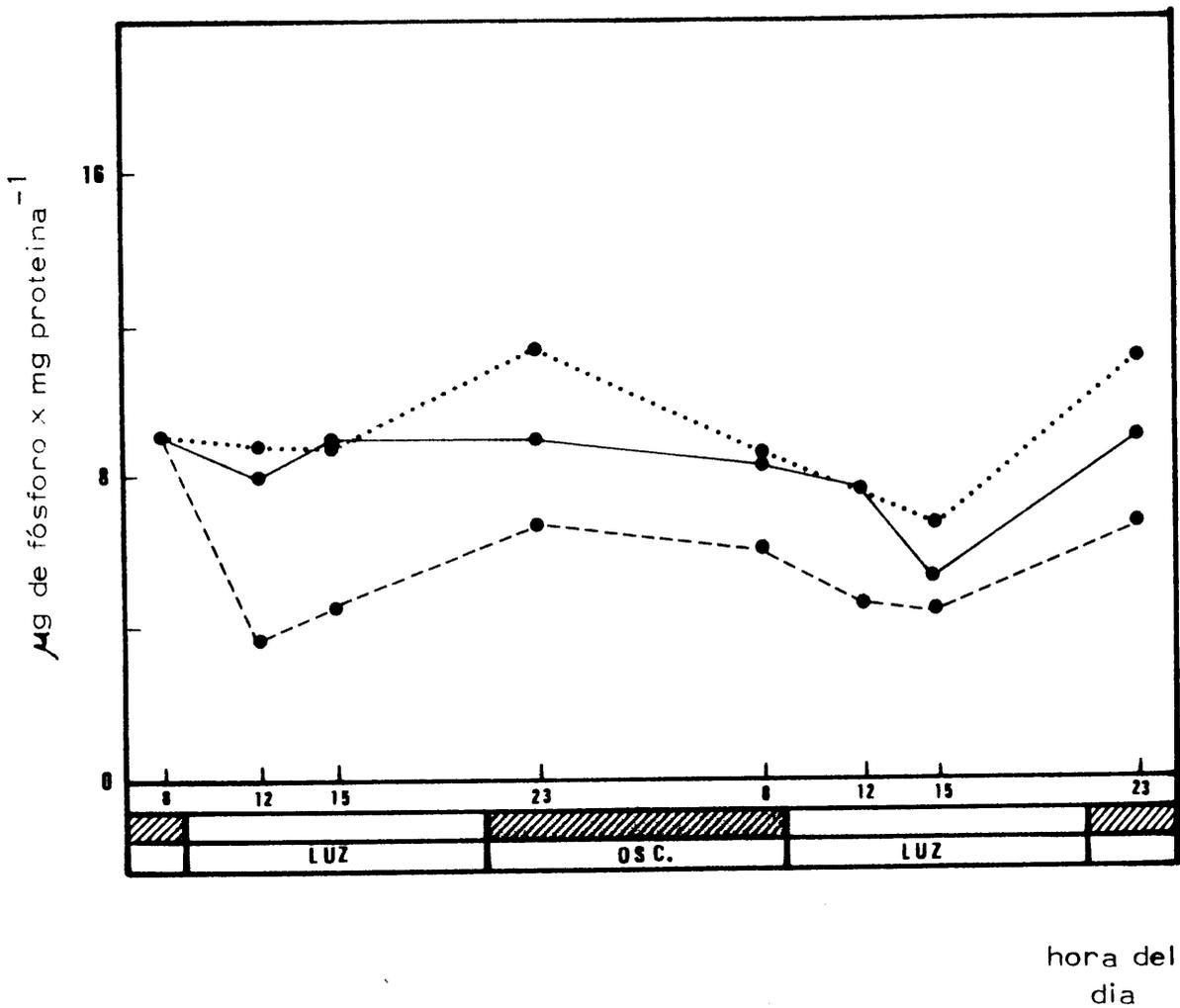


Fig. 26.- Contenido en fósforo lipídico total de microsomas hepáticos de pollos alimentados con dieta estándar (—); con dieta suplementada con colesterol al 5% (- - -) y privados de alimento (· · · · ·). Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

en colesterol muestran, a lo largo del intervalo observado, valores inferiores de fósforo lipídico, más acusados durante el periodo luminoso, y cuyo promedio es de $5\mu\text{g}$ por mg de proteína. En los animales ayunados, sin embargo, el valor promedio no presenta diferencias significativas respecto al de los controles.

Fosfolípidos mayoritarios. - A continuación se procedió a evaluar cada fosfolípido por separado. Las concentraciones de fósforo procedentes de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y esfingomiélinas se recogen en la tabla 28 y la contribución porcentual de cada uno de ellos en la tabla 29. Como puede verse en ellas, los valores obtenidos de los animales controles se mantienen relativamente constantes.

Los animales tratados con dieta de colesterol, presentan niveles medios inferiores a los controles en todos los fosfolípidos estudiados, destacando sobre todo los de fosfatidilcolina, cuyos valores más bajos correspondieron al periodo luminoso del ciclo (fig. 27). No obstante, los porcentajes relativos de cada uno de ellos no mostraron cambios importantes respecto a los valores controles (fig. 28).

En los animales ayunados, los valores de fosfatidiletanolamina aparecen incrementados respecto a los de animales alimentados; asimismo se presentan niveles de esfingomiélinas ligeramente mayores en todos los puntos, no obstante, las diferencias encontradas son, en este último caso, de menor cuantía y en términos absolutos, poco importantes (fig. 27). Hay que señalar también que los cambios habidos en las contribuciones porcentuales medias de cada fosfolípido fueron, en todos los casos, inferiores al 7 % (fig. 28).

TABLA 28

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta (5%) sobre el contenido de los microsomas hepáticos en esfingomielina (SM); fosfatidilcolina (PC); fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE). C. ilum = ciclo de iluminación; h. hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores obtenidos a partir de cinco animales $\bar{X} \pm$ S. E. M. = valor promedio \pm error de la media P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles

C. ilum.		Fósforo lipídico ($\mu\text{g} \times \text{mg proteína}^{-1}$)												h. t.
		Dieta estandar				Dieta + colesterol				Ayuno				
t. de exp.	h	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	h. t.
08:00	11	0.18	4.11	0.27	2.33	--	--	--	--	--	--	--	--	0
12:00	3	0.38	4.73	0.14	1.79	0.29	2.45	0.11	1.03	0.58	5.09	0.64	2.56	4
15:00	6	0.24	5.38	0.48	1.90	--	3.14	0.07	1.50	0.92	4.52	0.30	2.53	7
23:00	2	0.21	5.10	0.29	1.10	0.25	3.96	0.17	1.22	0.87	6.41	0.41	3.43	15
08:00	11	0.27	4.97	0.39	1.90	0.14	3.91	0.08	1.56	0.68	4.99	0.23	2.29	24
12:00	3	0.36	4.01	0.37	1.54	0.05	2.91	0.14	0.72	---	--	--	--	28
15:00	6	0.34	4.47	0.52	2.28	0.08	2.31	0.03	1.10	0.47	3.3	0.25	2.09	31
23:00	2	0.32	3.93	0.61	1.82	0.08	3.80	0.19	1.62	0.73	6.86	0.32	3.10	39
$\bar{X} \pm$ S. E. M.		0.29	4.59	0.38	1.83	0.15	3.21	0.11	1.25	0.71	5.19	0.36	2.67	
		\pm 0.03	\pm 0.19	\pm 0.05	\pm 0.14	\pm 0.04	\pm 0.26	\pm 0.02	\pm 0.12	\pm 0.07	\pm 0.53	\pm 0.06	\pm 0.21	
P						<0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.30	<0.80	<0.01	

TABLA 29

Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de las membranas microsomales hepáticas. SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina; C. ilum. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media. P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles

C. ilum. t. de		Fosforo lipídico (%)												h. t.
		Dieta estandar				Dieta + colesterol				Ayuno				
h	exp.	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	
08:00	11	2.6	59.6	3.9	33.8	--	--	--	--	--	--	--	--	0
12:00	3	5.4	67.2	2.0	25.4	7.5	63.1	2.8	26.5	6.5	57.4	7.2	28.9	4
15:00	6	3.0	67.3	6.0	23.7	--	66.7	1.5	31.8	11.1	54.6	3.6	30.6	7
23:00	2	3.1	76.1	4.3	16.4	4.5	70.7	3.0	21.8	7.8	57.6	3.7	30.8	15
08:00	11	3.6	66.0	5.2	25.2	2.5	68.7	1.4	27.4	8.3	60.9	2.8	28.0	24
12:00	3	5.7	63.8	5.9	24.5	1.3	76.2	3.7	18.8	--	--	--	--	28
15:00	6	4.5	58.7	6.8	30.0	2.3	65.6	0.8	31.2	7.7	54.0	4.1	34.2	31
23:00	2	4.8	58.8	9.1	27.2	1.4	66.8	3.3	28.5	6.6	62.3	2.9	28.1	39
$\bar{X} \pm S. E. M.$		4.1 \pm 0.4	64.7 \pm 2.1	5.4 \pm 0.7	25.8 \pm 1.8	3.2 \pm 1.0	68.2 \pm 1.6	2.4 \pm 0.4	26.6 \pm 1.8	8.0 \pm 0.7	57.8 \pm 1.3	4.0 \pm 0.7	30.1 \pm 1.0	
P						<0.50	<0.30	<0.01	<0.80	<0.01	<0.05	<0.30	<0.10	

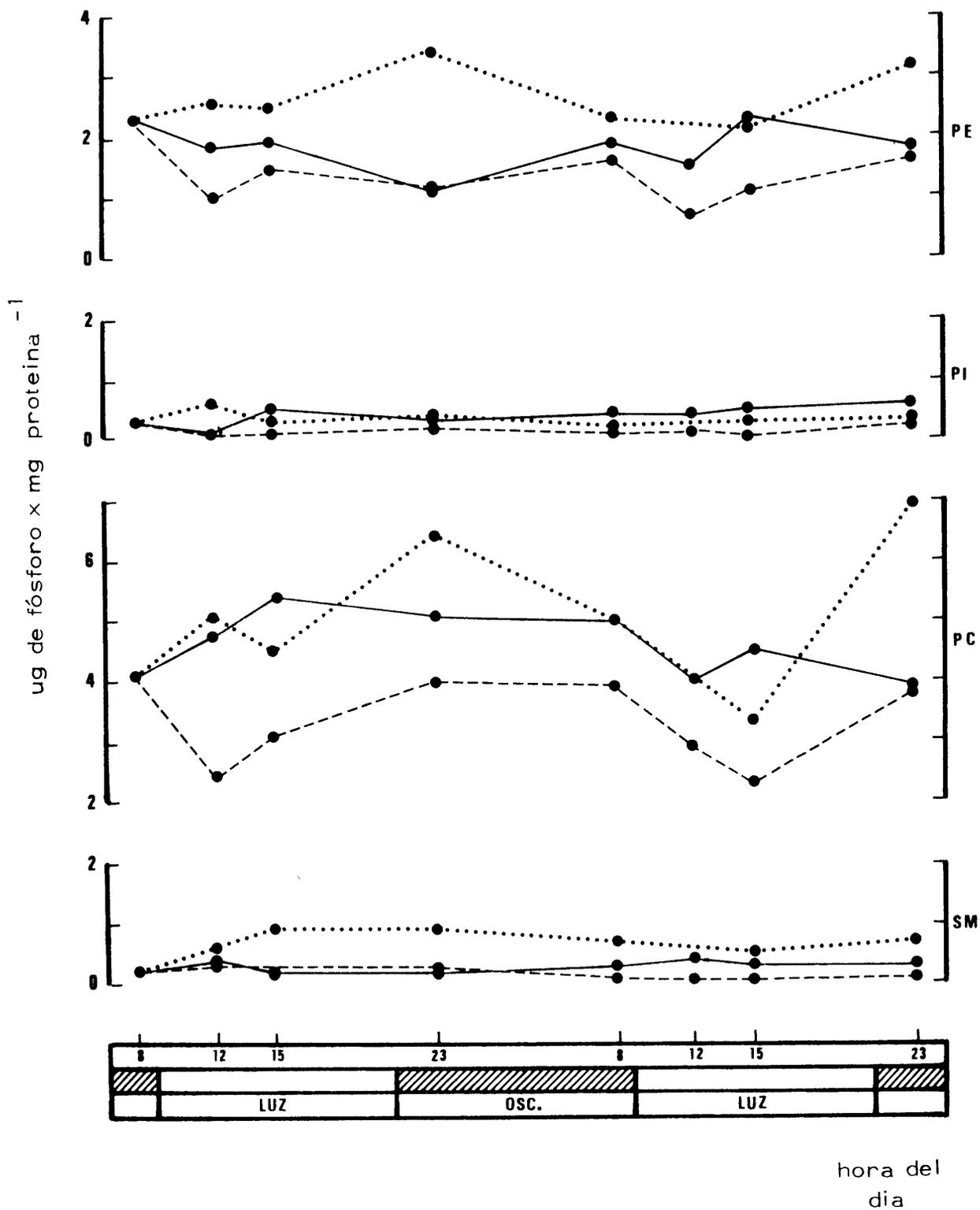


Fig. 27.- Contenido en fosfolípidos mayoritarios de microsomas hepáticos de pollos alimentados con dieta estandar (—), dieta suplementada con colesterol al 5 % (- - -) y privados de alimento (· · · · ·) SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

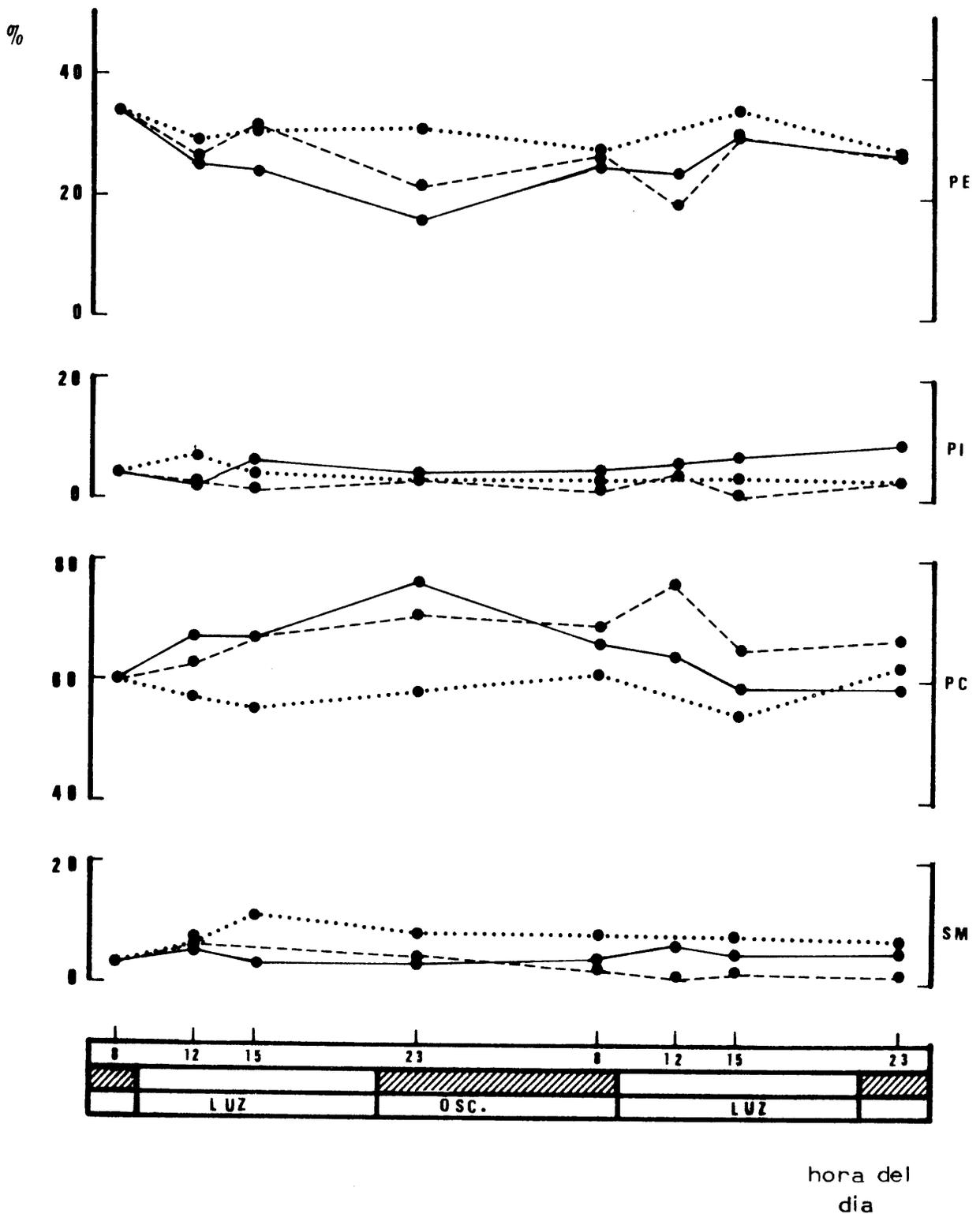


Fig. 28.- Composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de microsomas hepáticos de pollos alimentados con dieta estandar (—); dieta suplementada con colesterol al 5 % (---) y privados de alimento (.....). SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

4.4.2.3. - Variaciones en la relación molar colesterol / fósforo lipídico

Según se desprende de los valores contenidos en la tabla 30, tampoco la relación molar colesterol / fósforo lipídico muestra variaciones importantes a lo largo del día en los animales alimentados con dieta estandar manteniéndose aproximadamente constante en torno a un valor de 0.3 (fig. 29).

Este cociente sufre sin embargo, en los animales alimentados con dieta rica en colesterol, un fuerte incremento que se manifiesta ya claramente, a las cuatro horas del comienzo del tratamiento, tendiendo luego a estabilizarse en un valor próximo a 0.7, aunque con diferencias horarias que tienden a presentar valores máximos hacia la mitad del periodo luminoso.

Los animales sometidos al ayuno presentan, a lo largo del periodo estudiado, valores mucho más próximos a los controles, aunque ligeramente más bajos, que tienden a estabilizarse alrededor de 0,2 (fig. 29)

4.4.2. - Microsomas de duodeno

4.4.2.1. - Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado

Los niveles microsomales de colesterol total en este tejido no muestran cambios diurnos significativos (tabla 31). Estos valores se mantienen alrededor de 35 μg por mg de proteína y no son afectados por la die-

TABLA 30

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la razón molar colesterol / fosforo lipidico (C/P) en microsomas hepáticos de pollos de 11 días. C. ilum. = ciclo de iluminación; h= horas del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; hora trat. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor medio \pm error de la media. P = nivel de significación de la T de Student respecto al promedio de los controles.

C. ilumin.		Fracción molar C/P			
H	tiempo de exposición	Dieta estandar	Dieta + colesterol	Ayuno	hora tratamiento
08:00	11	0.314	--	--	0
12:00	3	0.257	0.614	0.252	4
15:00	6	0.265	0.766	0.218	7
23:00	2	0.240	0.567	0.226	15
08:00	11	0.362	0.627	0.203	24
12:00	3	0.227	0.798	--	28
15:00	6	0.352	0.771	0.212	31
23:00	2	0.337	0.671	0.221	39
$\bar{X} \pm S.E.M.$		0.294 \pm 0.019	0.688 \pm 0.034	0.222 \pm 0.007	
P			<0.01	<0.01	

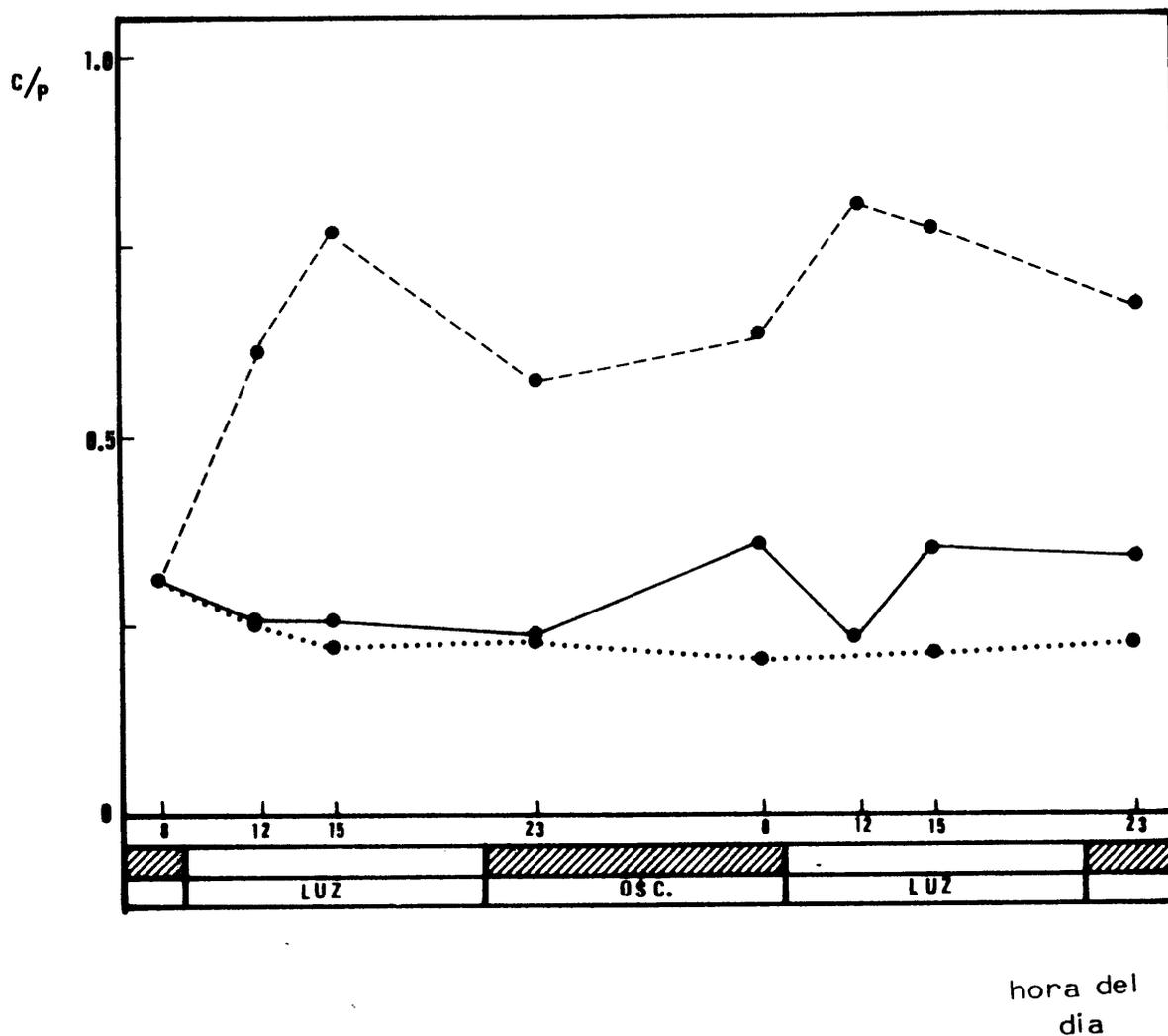


Fig. 29.- Influencia del ayuno y de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la fracción molar colesterol / fosforo lipídico en microsomas hepáticos. (—) animales controles; (---) animales alimentados con dieta de colesterol; (····) animales privados de alimento.

TABLA 31

Efecto del ayuno y de la suplementación de colesterol al 5 % en la dieta sobre el contenido en colesterol total, libre y esterificado de microsomas duodenales. Pollos con 11 días de edad. h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) ó a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; C. tot. = colesterol total; L = colesterol libre; E = colesterol esterificado; h. t. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media; P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio control.

C. ilum.		Dieta estandar			Dieta + colesterol			Ayuno			h. t.
t. de	h. exp.	C. tot.	L	E	C. tot.	L	E	C. tot.	L	E	
		($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	(%)	(%)	
08:00	11	36.1	87.2	12.8	---	---	---	---	---	---	0
12:00	3	28.6	78.4	21.6	37.3	87.4	12.5	33.1	74.5	25.5	4
15:00	6	38.3	88.4	11.6	29.3	100	0	36.6	83.3	16.7	7
23:00	2	36.4	100	0	42.1	88.3	11.7	37.3	83.3	16.7	15
08:00	11	34.5	100	0	35.1	100	0	59.8	85.7	14.3	24
12:00	3	32.8	82.6	17.4	35.8	78.4	21.6	41.2	79.2	20.8	28
15:00	6	35.6	82.8	17.2	24.1	72.7	27.3	---	---	---	31
23:00	2	38.7	100	0	41.7	68.3	31.6	50.4	83.3	16.4	39
$\bar{X} \pm S. E. M.$		35.1 \pm 1.1	89.9 \pm 3.1	16.1 \pm 1.8	35.1 \pm 2.4	85.0 \pm 4.7	20.9 \pm 3.9	43.1 \pm 4.1	81.5 \pm 1.6	18.4 \pm 1.6	
P					<0.90	<0.50	<0.30	<0.10	<0.10	<0.50	

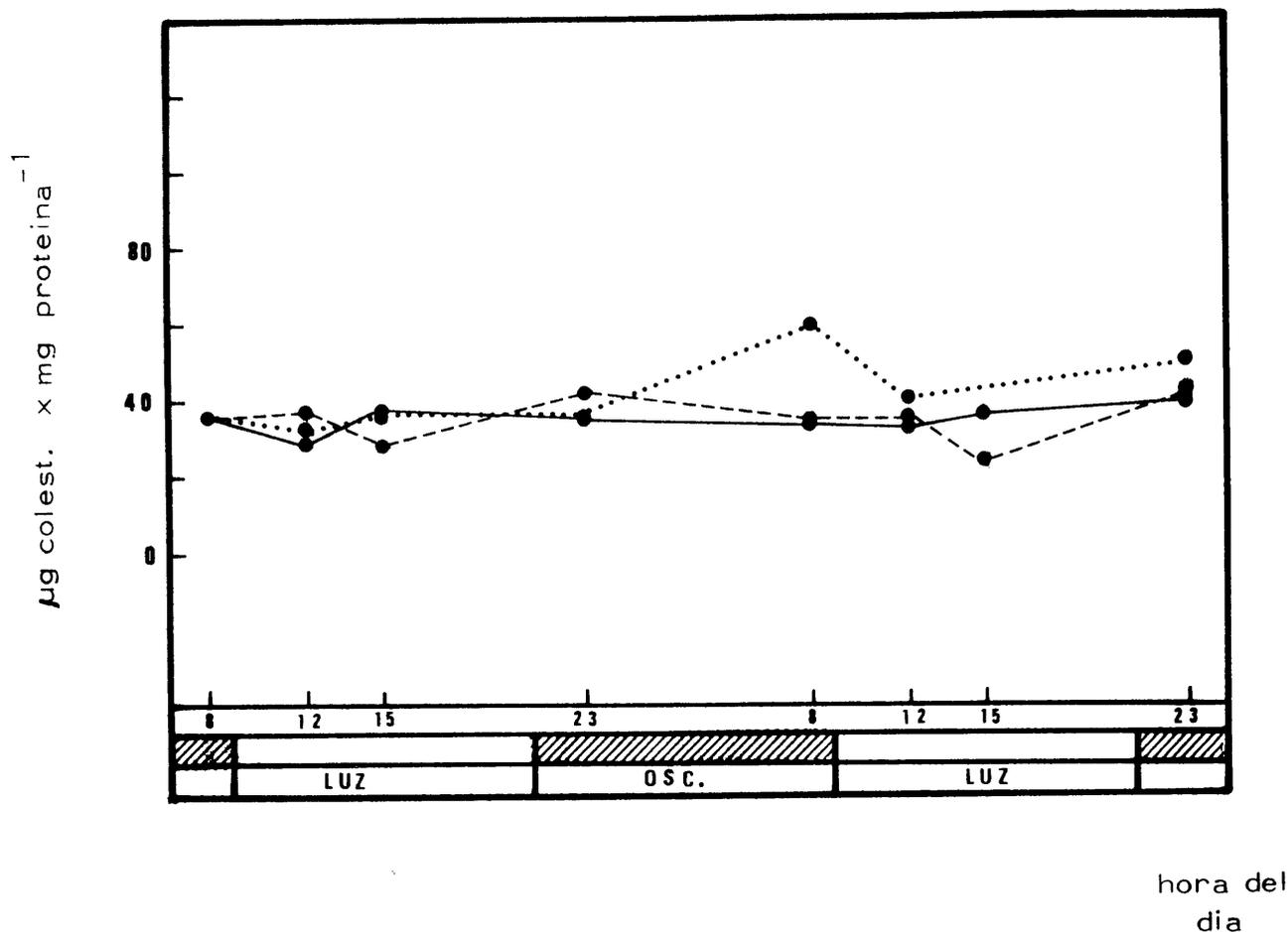


Fig. 30. - Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre el contenido en colesterol total de los microsomas duodenales. (—) animales controles ; (- - -) animales alimentados con una dieta suplementada con colesterol al 5 %; (· · · ·) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

ta rica en colesterol (fig. 30). La incidencia del ayuno es también escasa. No obstante, a partir de las 15 horas de tratamiento se observa , en este último caso, un incremento que aunque estadísticamente significativo en promedio, es cuantitativamente pequeño.

La composición en colesterol libre y esterificado gira en torno al 90 % y 10 % respectivamente (tabla 31), mostrando ligeras variaciones horarias, que tienden a reducir estas diferencias hacia la mitad de la fase luminosa. Los tratamientos de dieta de colesterol y ayuno presentan tendencia, asimismo, a acercar levemente estos porcentajes a partir de las 15 horas de tratamiento (fig. 31), aunque, en promedio, las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

4.4.2.2. - Variaciones del contenido en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol

Fosfolípidos totales. - La característica más prominente de los datos de fósforo lipídico, recogidos en la tabla 32 es su escasa variabilidad, tanto en función de la hora del día como en función de los tratamientos aplicados. Los valores se sitúan en torno a 7 μ g por mg de proteína y como puede apreciarse en la fig. 32 se mantienen relativamente constantes a lo largo del periodo estudiado.

Fosfolípidos mayoritarios. - Tampoco los niveles de fosfatilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol, presentan cambios importantes en el tiempo, o como consecuencia de los tratamientos aplicados (tablas 33 y 34). Hay que destacar, no obstante, que tanto en animales

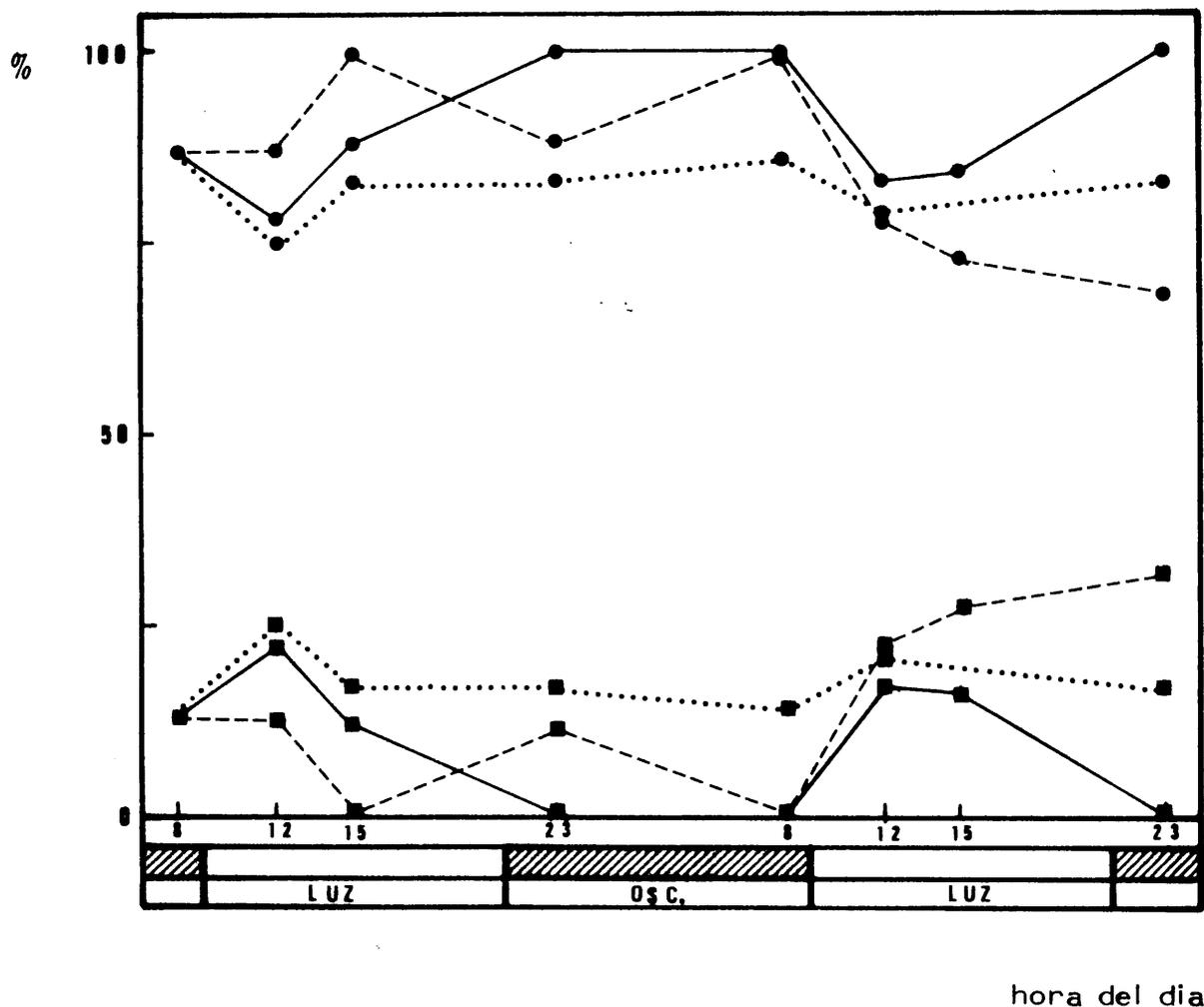


Fig. 31. - Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en colesterol libre (●) y esterificado (■) de los microsomas duodenales. (—) animales controles; (----) animales alimentados con una dieta de colesterol al 5%; (.....) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo

TABLA 32

Cambios en el contenido de fósforo lipídico total de microsomas duodenales, inducidos por el ayuno y por una dieta de colesterol al 5%. Pollos de 11 días. C. ilumin. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; hora trat. = horas de tratamiento. Los valores se han obtenido a partir de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

C. ilumin.		Fósforo total ($\mu\text{g} \times \text{mg proteina}^{-1}$)			
H	tiempo de exposición	Dieta estandar	Dieta + colesterol	Ayuno	hora tratamiento
08:00	11	8.6	--	--	0
12:00	3	6.8	6.3	6.6	4
15:00	6	8.4	6.7	7.1	7
23:00	2	9.0	8.5	6.9	15
08:00	11	6.9	6.4	8.7	24
12:00	3	8.5	6.4	6.0	28
15:00	6	7.3	5.4	--	31
23:00	2	7.2	7.8	7.5	39
$\bar{X} \pm S.E.M.$		7.8 ± 0.3	6.8 ± 0.4	7.1 ± 0.4	
P			<0.10	<0.20	

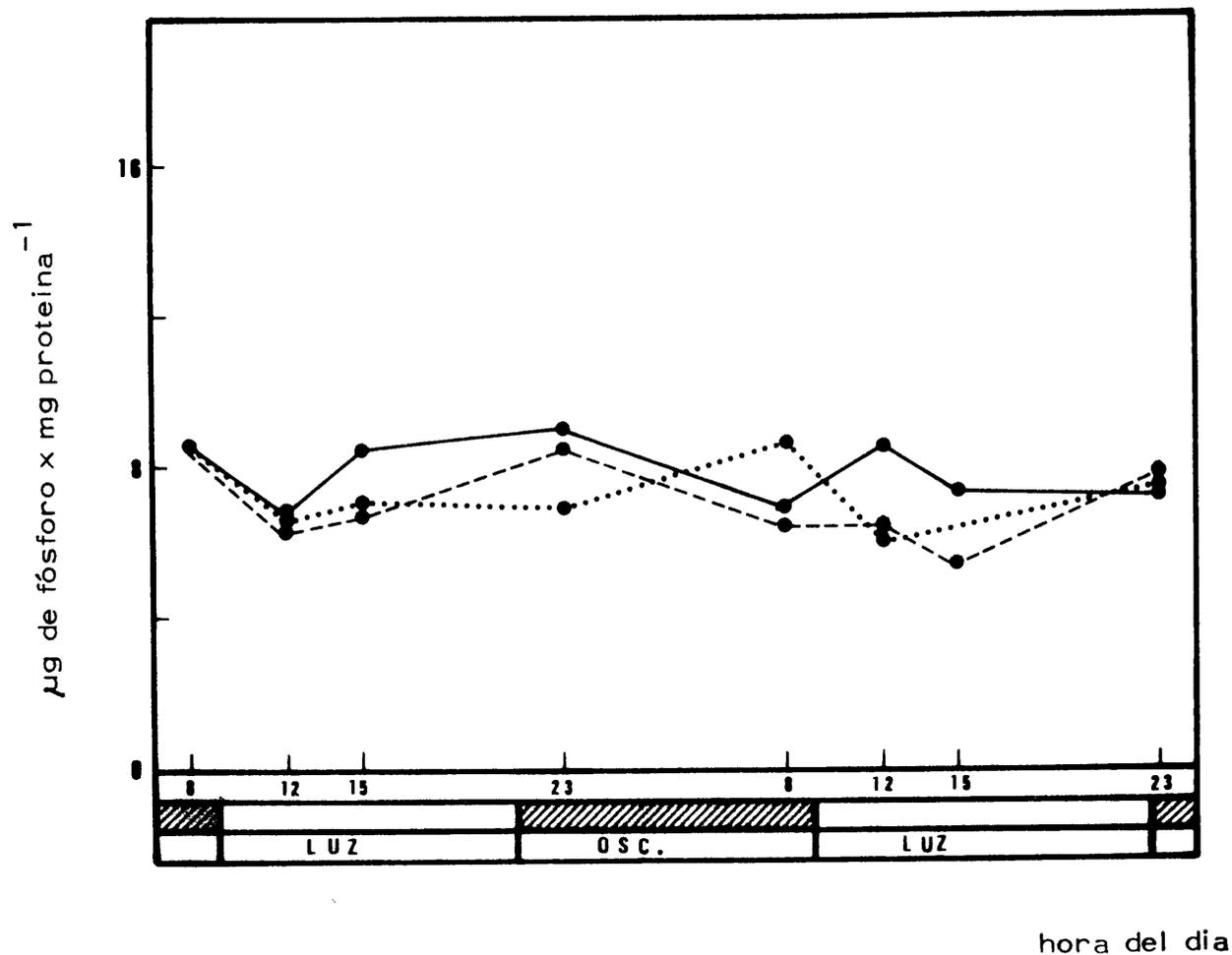


Fig. 32.- Contenido en fósforo lipídico total de microsomas duodenales de pollos alimentados con dieta estandar (—); con dieta suplementada con colesterol al 5 % (- - -); y privados de alimento (· · · · ·). Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

TABLA 33

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta (5%) sobre el contenido de los microsomas duodenales en esfingomielina (SM); fosfatidilcolina (PC); Fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE). C. ilum = ciclo de iluminación; h.= hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad(▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores obtenidos a partir de cinco animales $\bar{X} \pm$ S. E. M. = valor promedio \pm error de la media P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles

C. ilum. t. de		Fosforo lipídico ($\mu\text{g} \times \text{mg proteina}^{-1}$)												h. t.
		Dieta estandar				Dieta + colesterol				Ayuno				
h	exp.	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	
08:00	11	0.86	3.34	0.52	1.40	--	--	--	--	--	--	--	--	0
12:00	3	0.76	2.25	0.38	1.67	0.35	2.17	0.08	1.65	0.82	2.31	0	1.52	4
14:00	6	1.40	3.90	0.39	2.15	0.61	2.96	0.03	1.83	0.79	3.96	0	1.58	7
23:00	2	0.97	3.41	0.86	2.50	0.99	4.22	0.20	2.51	0.55	3.91	0	1.81	15
08:00	11	0.69	3.11	0.35	2.02	0.79	3.01	0	1.97	1.01	4.51	0	2.54	24
12:00	3	0.74	3.92	0.14	1.29	0.59	3.34	0	1.78	0.83	3.54	0	1.81	28
15:00	6	0.75	3.50	0.35	1.66	0.34	2.72	0	1.39	--	--	0	--	31
23:00	2	0.74	3.47	0.37	1.61	1.64	4.30	0	2.46	1.17	5.03	0	2.57	39
$\bar{X} \pm$ S. E. M.		0.86 \pm 0.08	3.36 \pm 0.19	0.42 \pm 0.07	1.79 \pm 0.14	0.76 \pm 0.17	3.25 \pm 0.29	0.04 \pm 0.03	1.94 \pm 0.16	0.86 \pm 0.09	3.88 \pm 0.38	0	1.97 \pm 0.19	
P						<0.90	<0.90	<0.01	<0.40	<0.90	<0.30	--	<0.01	

TABLA 34

Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de las membranas microsomales duodenales. SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina; C. ilum. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm$ S. E. M. = valor promedio \pm error de la media. P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

C. ilum.		Fosforo lipídico (%)												h. t.
		Dieta estandar				Dieta + colesterol				Ayuno				
h	t. de exp.	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	
08:00	11	14.0	54.6	8.5	22.9	--	--	--	--	--	--	--	--	0
12:00	3	15.0	44.5	7.5	33.0	8.2	51.0	1.9	38.8	17.6	49.7	0	32.7	4
15:00	6	17.9	49.7	5.0	27.4	11.2	54.5	0.5	33.7	12.5	62.6	0	25.0	7
23:00	2	12.5	44.0	11.1	32.3	12.5	53.3	2.5	31.7	8.8	62.4	0	28.9	15
08:00	11	11.2	50.4	5.7	32.7	13.7	52.2	0	34.1	12.5	55.9	0	31.5	24
12:00	3	12.1	64.4	2.3	21.2	10.3	58.5	0	31.2	13.4	57.3	0	29.3	28
15:00	6	12.0	55.9	5.6	26.5	7.6	61.1	0	31.2	--	--	--	--	31
23:00	2	12.0	56.0	6.0	26.0	19.5	51.2	0	29.3	13.3	57.3	0	29.3	39
$\bar{X} \pm$ S. E. M.		13.3 \pm 0.8	52.4 \pm 2.4	6.5 \pm 0.9	27.7 \pm 1.6	11.9 \pm 1.6	54.5 \pm 1.0	0.7 \pm 0.4	32.9 \pm 1.2	13.0 \pm 1.1	57.5 \pm 1.9	--	29.4 \pm 1.1	
P						<0.40	<0.50	<0.01	<0.05	<0.90	<0.20	--	<0.50	

ayunados como en animales tratados con la dieta rica en colesterol, los niveles de fosfatidilinositol aparecieron significativamente disminuidos, en promedio, con respecto a los valores controles; de hecho, muchas de las determinaciones fueron negativas. Sin embargo, y teniendo en cuenta la ya muy baja concentración presente en los controles, estas diferencias pudieran no ser relevantes, dado que se trabaja en el umbral inferior de sensibilidad de la técnica analítica. Las cantidades absolutas y porcentuales de todas ellas se ilustran en las figs. 33 y 34.

4.4.2.3. - Variaciones en la relación molar colesterol / fósforo lipídico

En los animales controles, la relación molar C/P se sitúa alrededor de un valor, aproximadamente constante, de 0.36 (tabla 35). Este valor no se modifica significativamente para los pollos alimentados con la dieta de colesterol, aunque aumenta lentamente en los pollos ayunados hasta algo más de 0.5. El efecto del ayuno se inicia casi desde el comienzo y aunque, en promedio, tiene significación estadística, no es tan acusado como el provocado en hígado por la dieta de colesterol (fig. 35).

4.4.3. - Microsomas de cerebro

4.4.3.1. - Variaciones del contenido en colesterol total, libre y esterificado

En cerebro, los valores microsomales obtenidos para el colesterol total no sufren, como era de esperar cambios apreciables en fun-

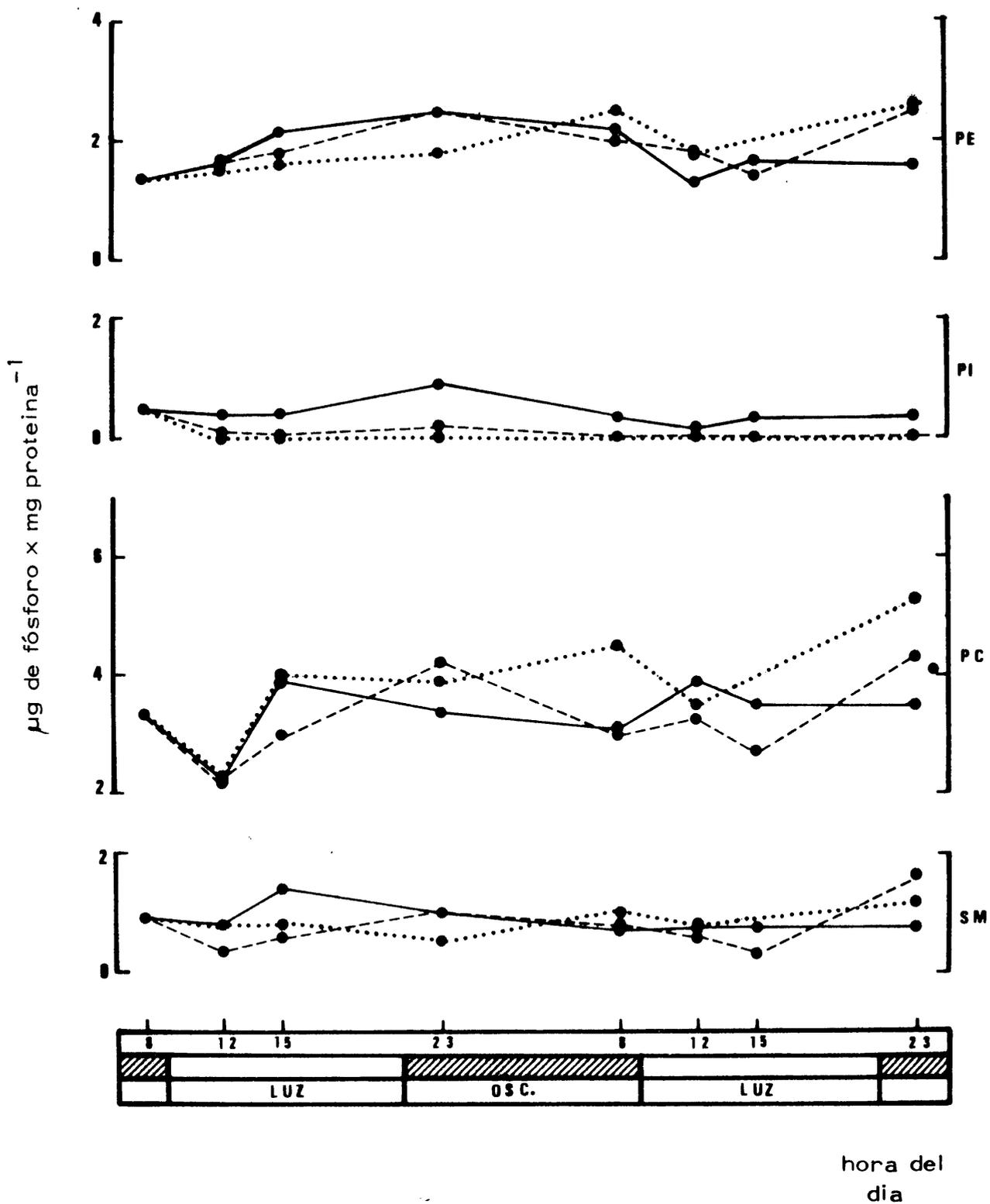


Fig. 33.- Contenido en fosfolípidos mayoritarios de microsomas duodenales de pollos alimentados con dieta estandar (—); dieta suplementada con colesterol al 5% (---) y privados de alimento (····). SM = esfingomielinea; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

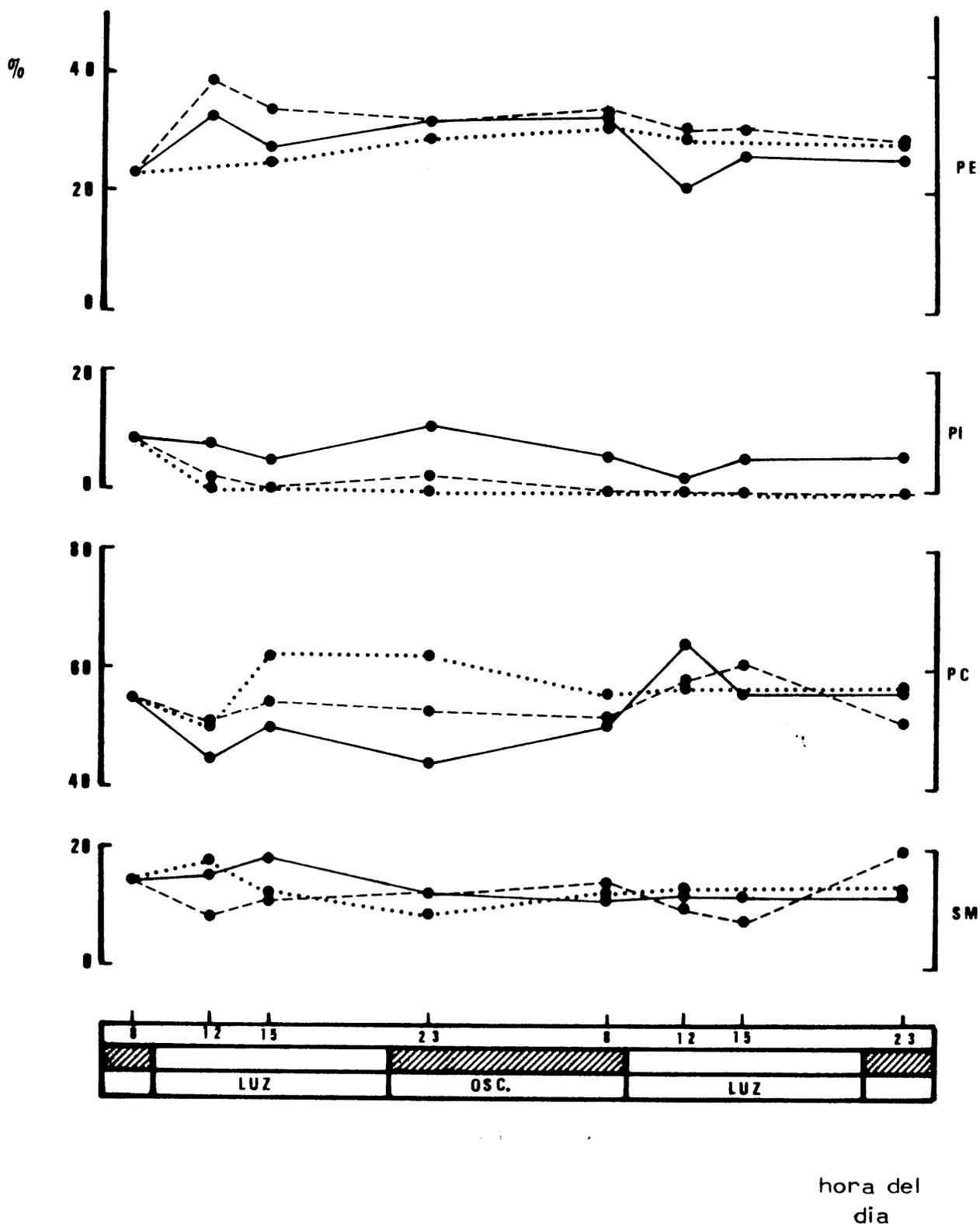


Fig. 34.- Composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de microsomas duodenales de pollos alimentados con dieta estandar (—); dieta suplementada con colesterol al 5 % (---) y privados de alimento (.....). SM = esfingomiélna; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo

TABLA 35

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la razón molar colesterol / fósforo lipídico (C/P) en microsomas duodenales de pollos de 11 días. C. ilum. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; hora trat. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor medio \pm error de la media. P = nivel de significación de la t de Student respecto al promedio de los controles.

C. ilumin		Fracción molar C/P			hora tratamiento
H	tiempo de exposición	Dieta estandar	Dieta+ colesterol	Ayuno	
08:00	11	0.336	--	--	0
12:00	3	0.336	0.474	0.401	4
15:00	6	0.365	0.350	0.412	7
23:00	2	0.323	0.396	0.432	15
08:00	11	0.400	0.439	0.550	24
12:00	3	0.309	0.447	0.549	28
15:00	6	0.390	0.357	--	31
23:00	2	0.430	0.428	0.538	39
$\bar{X} \pm S. E. M.$		0.361 \pm 0.015	0.413 \pm 0.018	0.480 \pm 0.029	
P			<0.10	<0.01	

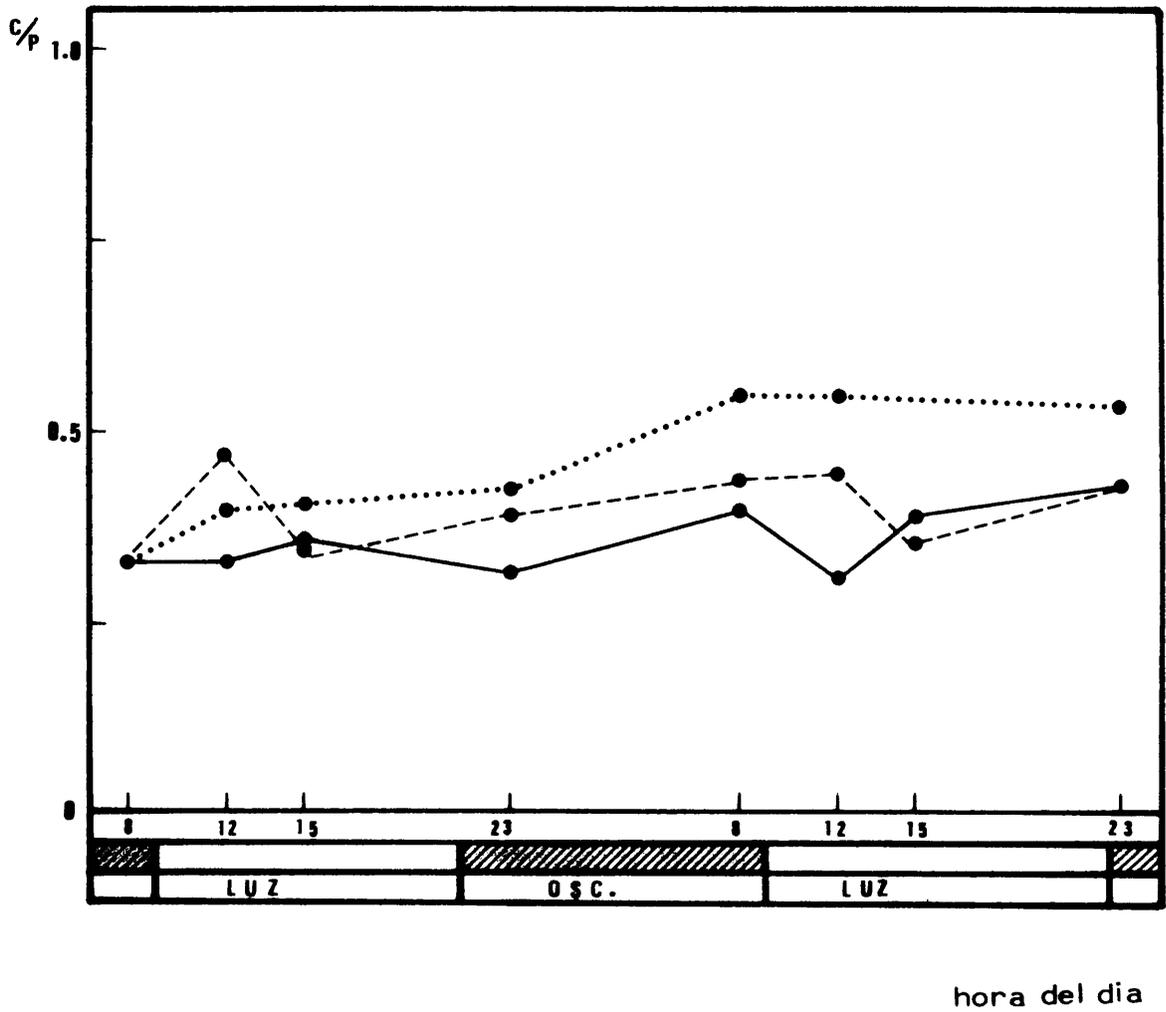


Fig. 35.- Influencia del ayuno y de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la fracción molar colesterol / fósforo lipídico en microsomas duodenales. (—) animales controles, (---) animales alimentados con dieta de colesterol (.....) animales privados de alimento.

ción de la hora del día, adoptando un valor medio del orden de $44.1 \mu\text{g}$ por mg de proteína, superior al encontrado en hígado y duodeno (tabla 36). Bajo una dieta rica en colesterol, dichos valores permanecen prácticamente inalterados, como se desprende de los datos contenidos en la tabla, y como también puede verse en la fig. 36. Las lecturas **realizadas** sobre microsomas de pollos privados de alimento son casi desde el principio, ligeramente menores, siendo su promedio de $35,5 \mu\text{g}$ por mg de proteína.

Como los otros tejidos estudiados, la mayor parte de este colesterol se presenta en forma libre (79 %), constituyendo los ésteres tan solo un 21 % del total (tabla 36) sin que esta proporción sufra modificaciones correlacionables con el ciclo diurno (fig. 37). Bajo ninguno de los dos tratamientos habituales se han encontrado diferencias medias significativas durante el periodo registrado.

4. 4. 3. 2. - Variaciones del contenido en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilinositol

Fosfolípidos totales. - Los valores encontrados de fósforo lipídico (tabla 37) indican que el contenido en fosfolípidos totales de los microsomas cerebrales es sensiblemente superior al encontrado en hígado y duodeno, alcanzando un valor promedio de $12.4 \mu\text{g}$ por mg de proteína. El tratamiento con dieta rica en colesterol no tuvo ningún efecto sobre dicho contenido, siendo sus valores, en todos los puntos, muy próximos a los obtenidos para los controles (fig. 38). Los animales ayunados por su parte, exhiben valores inferiores, en general, a los controles siendo su promedio de 9.8 mg por mg de proteína.

TABLA 36

Efecto del ayuno y de la suplementación de colesterol al 5 % en la dieta sobre el contenido en colesterol total, libre y esterificado de microsomas cerebrales. Pollos con 11 días de edad. h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) ó a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; C. tot. = colesterol total; L = colesterol libre; E = colesterol esterificado; h. t = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media; P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio control.

C. ilum.		Dieta estandar			Dieta + colesterol			Ayuno			
h.	t. de exp.	C. tot. ($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	L (%)	E (%)	C. tot. ($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	L (%)	E (%)	C. tot. ($\mu\text{g} \times \text{mg P}^{-1}$)	L (%)	E (%)	h. t.
08:00	11	40.4	75.0	25.0	---	---	---	---	---	---	0
12:00	3	52.4	81.0	19.0	55.4	88.3	11.6	34.9	88.5	11.5	4
15:00	6	39.1	92.0	8.0	45.5	90.8	9.1	34.5	74.2	25.8	7
23:00	2	44.3	92.5	7.5	43.0	85.7	14.3	41.3	79.5	20.5	15
08:00	11	37.1	84.3	15.7	53.0	78.9	21.1	35.1	81.5	18.5	24
12:00	3	51.1	71.4	28.6	43.2	83.3	16.7	33.8	72.1	27.9	28
15:00	6	46.7	65.2	34.7	51.2	85.7	14.3	27.4	73.1	26.9	31
23:00	2	41.8	69.2	30.7	48.3	86.1	13.9	41.6	75.4	24.6	39
$\bar{X} \pm S. E. M.$		44.1 \pm 2.0	78.8 \pm 3.6	21.2 \pm 3.6	48.5 \pm 1.8	85.5 \pm 1.4	14.5 \pm 1.4	35.5 \pm 1.8	77.8 \pm 2.2	22.2 \pm 2.2	
P					<0.20	<0.20	<0.20	<0.01	<0.90	<0.90	

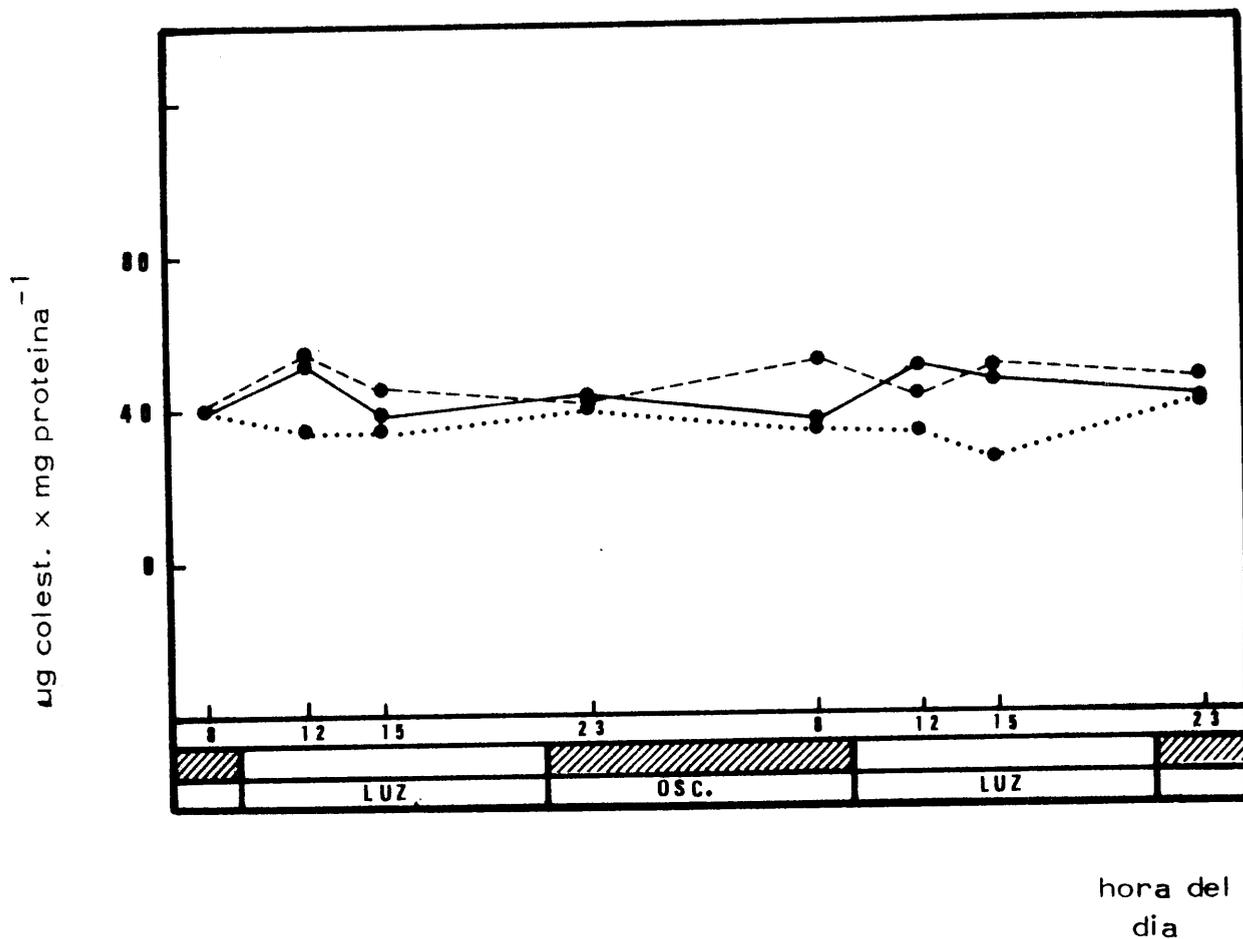


Fig. 36.- Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre el contenido en colesterol total de los microsomas cerebrales. (—) animales controles; (---) animales alimentados con una dieta suplementada con colesterol al 5 %; (·····) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

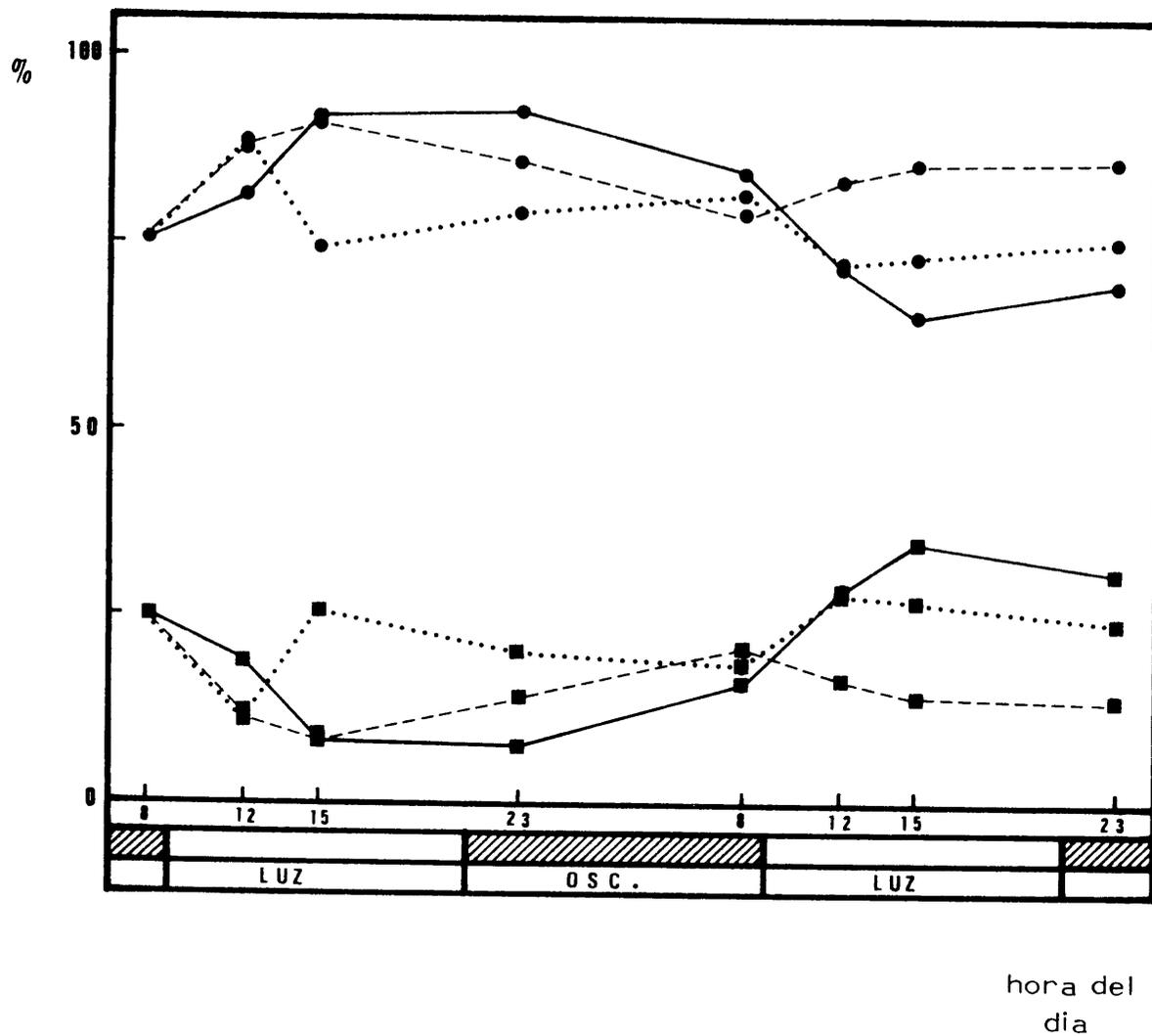


Fig. 37.- Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en colesterol libre (●) y esterificado (■) de los microsomas cerebrales. (—) animales controles; (---) animales alimentados con una dieta de colesterol al 5 %; (·····) animales ayunados. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

TABLA 37

Cambios en el contenido de fósforo lipídico total de microsomas cerebrales inducidos por el ayuno y por una dieta de colesterol al 5% Pollos de 11 días C. ilumin = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; hora trat. = horas de tratamiento. Los valores se han obtenido a partir de cinco animales. $\bar{X} \pm S. E. M.$ = valor promedio \pm error de la media P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

H	C. ilumin	tiempo de exposición	Fósforo total ($\mu\text{g} \times \text{mg proteína}^{-1}$)			hora tratamiento
			Dieta estandar	Dieta + colesterol	Ayuno	
08:00		11 	12.6	---	---	0
12:00		3 	15.0	13.9	9.9	4
15:00		6 	12.6	11.8	8.2	7
23:00		2 	12.3	13.2	11.2	15
08:00		11 	9.6	12.5	10.0	24
12:00		3 	14.4	11.1	10.0	28
15:0		6 	12.6	13.0	7.9	31
23:00		2 	10.2	10.8	11.6	39
$\bar{X} \pm S.E.M.$			12.4 \pm 0.6	12.3 \pm 0.4	9.8 \pm 0.5	
P				<0.90	<0.01	

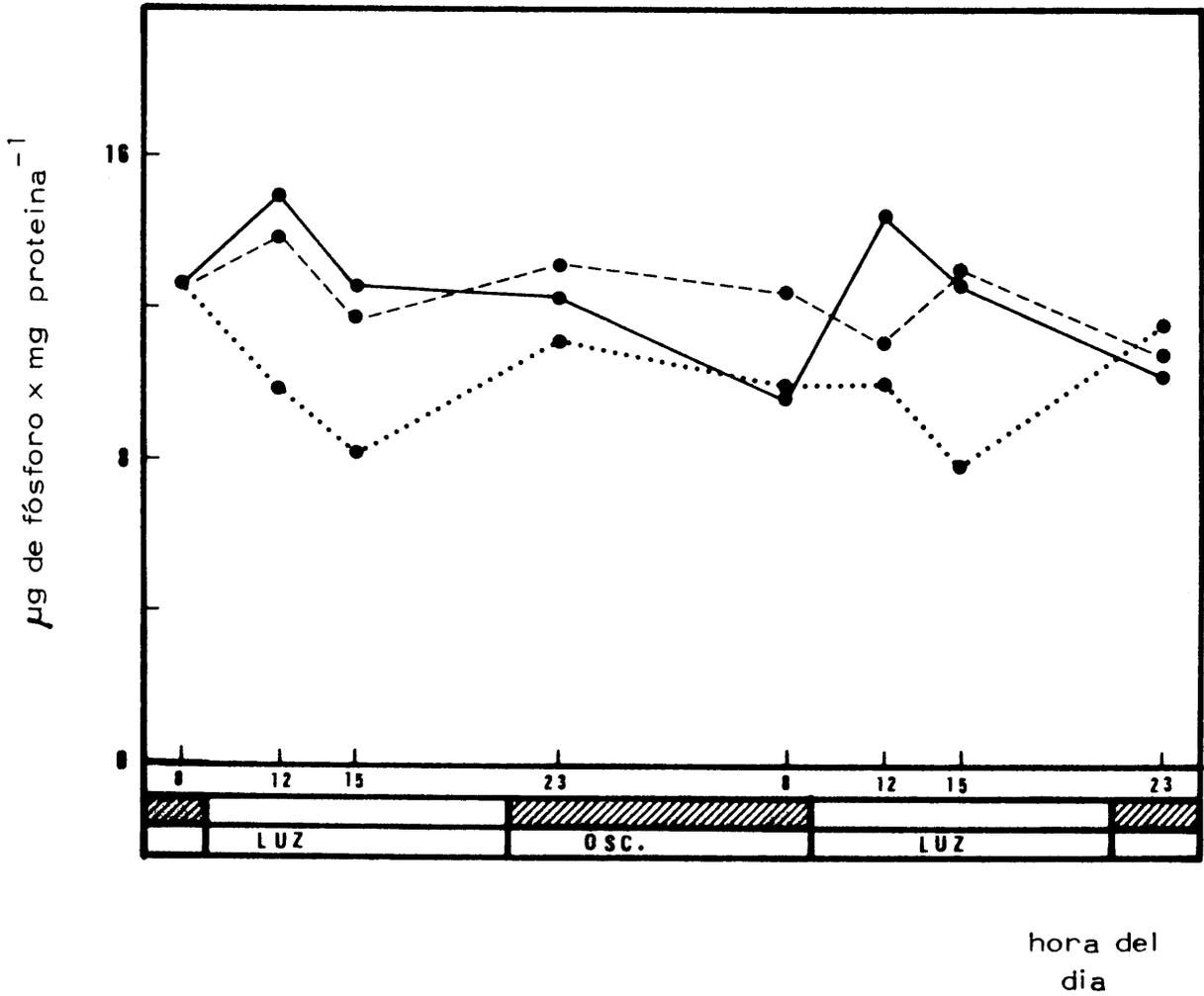


Fig. 38.- Contenido en fósforo lipídico total, de microsomas cerebrales de pollos alimentados con dieta estandar (—); con dieta suplementada con colesterol al 5 % (---); y privados de alimento (·····). Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo

Fosfolípidos mayoritarios. - Los fosfolípidos estudiados no muestran desviaciones horarias importantes (tabla 38). Los animales alimentados con dieta de colesterol, muestran niveles más bajos de esfingomielina y fosfatidiletanolamina (fig. 39). Ninguno de estos cambios trascendió, de manera singular, a la composición porcentual en la que no aparecen modificaciones superiores al 5 % (tabla 39 y fig. 40). La privación de alimento se cifró en descensos de los valores medios de fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidiletanolamina, cuyas diferencias aunque estadísticamente significativas son cuantitativamente pequeñas y ninguna de ellas acarrió cambios de interés al tanto por ciento de contribución de cada fosfolípido.

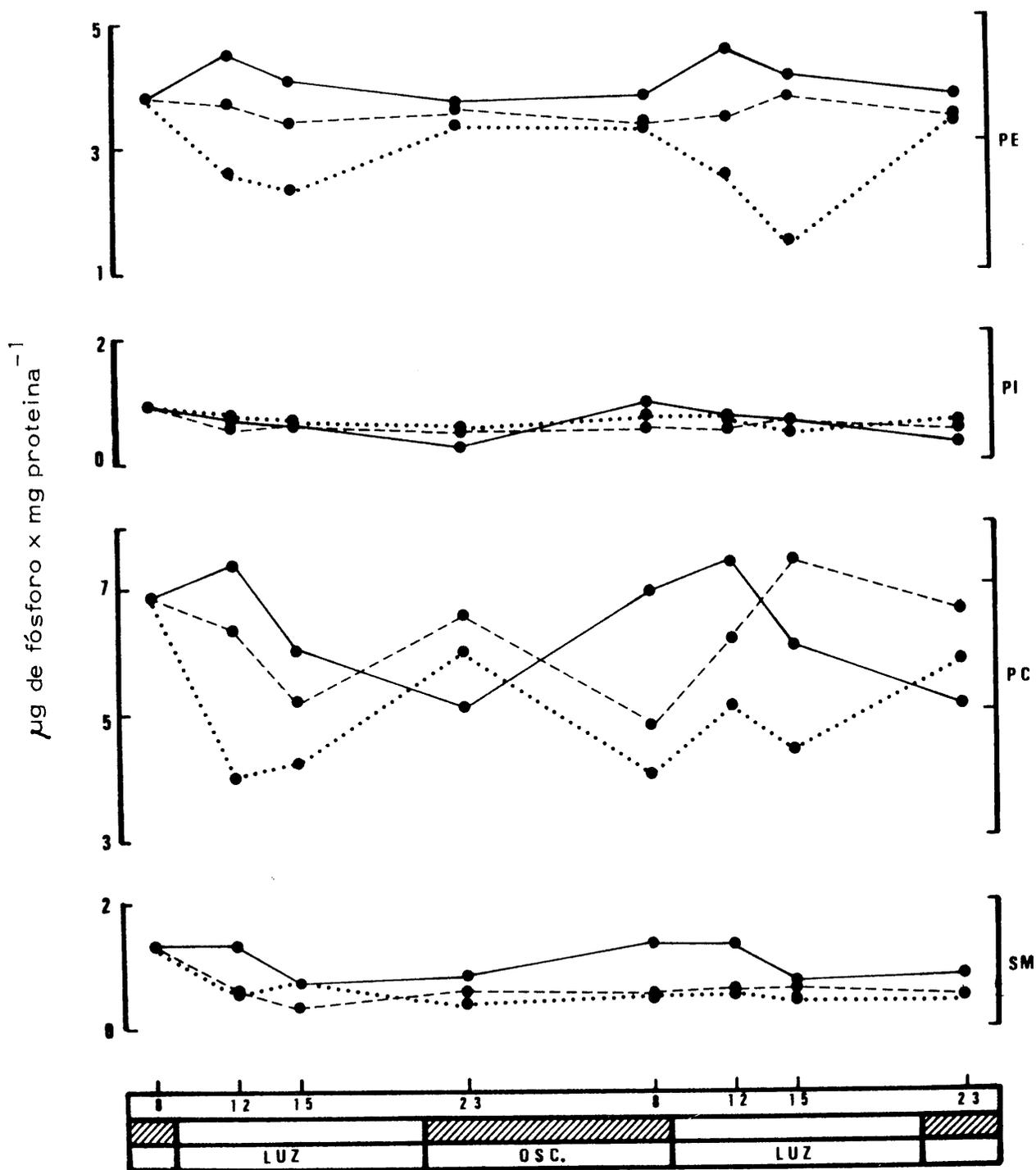
4.4.3.3. - Variaciones en la relación molar colesterol / fósforo lipídico

En la tabla 40 puede verse las fracciones molares C/P en cada caso. Dichos valores se han representado en la fig. 41. Como puede apreciarse en cualquiera de ellos el valor promedio, próximo a 0.3, no es alterado prácticamente por ninguno de los tratamientos aplicados y muestran una gran estabilidad a lo largo del día.

TABLA 38

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta (5%) sobre el contenido de los microsomas cerebrales en esfingomielina (SM); fosfatidilcolina (PC); fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE). C. ilum = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores obtenidos a partir de cinco animales. $\bar{X} \pm$ S. E. M. = valor promedio \pm error de la media P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

C. ilum.	t. de exp.	h.	Fósforo lipídico ($\mu\text{g} \times \text{mg proteína}^{-1}$)											h. t.	
			Dieta estandar				Dieta + colesterol				Ayuno				
			SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI		PE
		▨	1.31	6.87	0.88	3.81	--	--	--	--	--	--	--	0	
		□	1.30	7.41	0.70	4.51	0.60	6.38	0.60	3.70	0.58	4.01	0.80	2.60	4
		□	0.72	6.04	0.61	4.10	0.35	5.16	0.60	3.39	0.71	4.23	0.71	2.33	7
		▨	0.80	5.12	0.26	3.74	0.57	6.57	0.53	3.63	0.45	6.08	0.55	3.34	15
		▨	--	--	--	--	0.53	4.81	0.56	3.36	0.52	4.05	0.71	3.30	24
		□	--	--	--	--	0.58	6.15	0.52	3.38	0.46	5.10	0.64	2.51	28
		□	--	--	--	--	0.62	7.44	0.62	3.80	0.40	4.41	0.46	1.38	31
		▨	--	--	--	--	0.50	6.57	0.50	3.28	0.51	5.85	0.53	3.41	39
$\bar{X} \pm$	S. E. M.		1.03	6.36	0.61	4.05	0.54	6.15	0.56	3.51	0.52	5.33	0.63	2.70	
			0.16	0.50	0.13	0.17	0.03	0.34	0.02	0.08	0.04	0.30	0.04	0.28	
P							<0.01	<0.90	<0.90	<0.01	<0.01	<0.05	<0.90	<0.01	



hora del día

Fig. 39.- Contenido en fosfolípidos mayoritarios de microsomas cerebrales de pollos alimentados con dieta estandar (—); dieta suplementada con colesterol al 5 % (---) y privados de alimento (·····) SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo.

TABLA 39

Influencia del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de las membranas microsomales cerebrales. SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; PE = fosfatidiletanolamina; C. ilum. = ciclo de iluminación; h = hora del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; h. t. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm$ S.E.M. = valor promedio \pm error de la media. P = nivel de significación de la t de Student con respecto al promedio de los controles.

C. ilum.		Fósforo lipídico (%)												h. t.
		Dieta estándar				Dieta + colesterol				Ayuno				
h	exp.	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	SM	PC	PI	PE	
08:00	11	10.2	53.4	6.6	29.6	---	---	---	---	---	---	---	---	0
12:00	3	9.3	53.2	5.0	32.4	5.3	56.6	5.3	32.8	7.3	50.2	10.0	32.5	4
15:00	6	6.3	52.7	5.3	35.7	3.7	54.3	6.3	35.7	8.9	53.0	8.9	29.2	7
23:00	2	8.1	51.6	2.6	37.7	5.0	58.1	4.7	32.1	4.3	58.3	5.3	32.0	15
08:00	11	---	---	---	---	5.7	51.9	6.0	36.3	6.1	47.2	8.3	38.5	24
12:00	3	---	---	---	---	5.5	57.8	4.9	31.8	5.3	58.5	7.3	28.8	28
15:00	6	---	---	---	---	5.0	59.6	5.0	30.4	6.0	66.3	6.9	20.7	31
23:00	2	---	---	---	---	4.6	60.5	4.6	30.2	4.9	56.8	5.1	33.1	39
$\bar{X} \pm$ S. E. M.		8.5 \pm 0.8	52.7 \pm 0.4	4.9 \pm 0.9	33.8 \pm 1.8	5.0 \pm 0.2	57.0 \pm 1.1	5.2 \pm 0.2	32.8 \pm 0.9	6.1 \pm 0.6	55.8 \pm 2.4	7.4 \pm 0.7	30.7 \pm 2.0	
P						<0.01	<0.05	<0.90	<0.90	<0.05	<0.50	<0.10	<0.50	

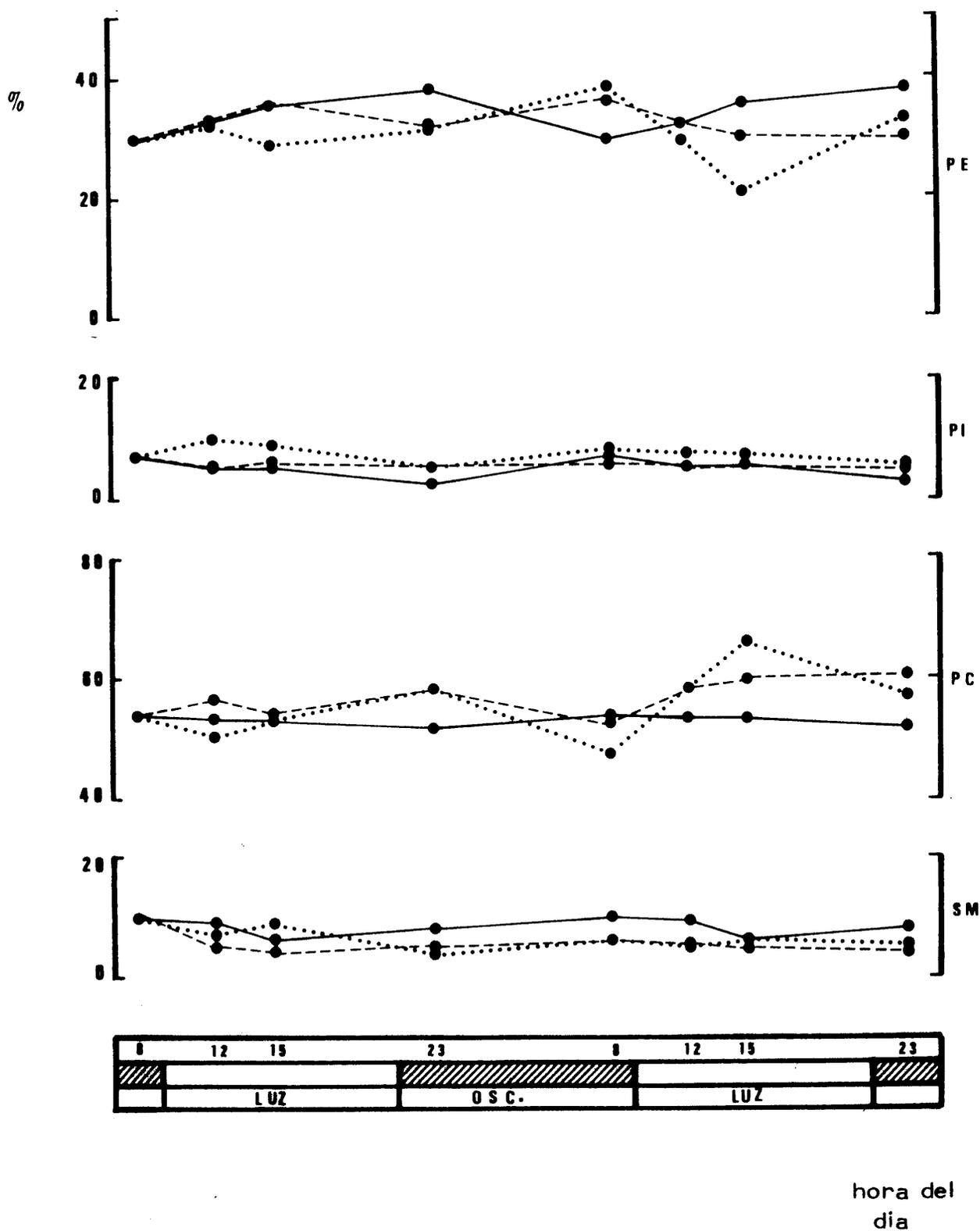


Fig. 40. - Composición porcentual en fosfolípidos mayoritarios de microsomas cerebrales de pollos alimentados con dieta estandar (—); dieta suplementada con colesterol al 5 % (---) y privados de alimento (.....) SM = esfingomielina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatilinositol; PE = fosfatidiletanolamina. Los tratamientos se iniciaron a las 8 horas del primer ciclo

TABLA 40

Efecto del ayuno y del colesterol de la dieta sobre la razón molar colesterol / fósforo lipídico (C/P) en microsomas cerebrales de pollos de 11 días. C. ilum. = ciclo de iluminación; h = horas del día; t. de exp. = horas de exposición a la luz (□) o a la oscuridad (▨) en el momento del sacrificio; hora trat. = horas de tratamiento. Valores procedentes de cinco animales. $\bar{X} \pm S.E.M.$ = valor medio error de la media P = nivel de significación de la T de Student respecto al promedio de los controles.

C. ilumin.		Fracción molar C / P			hora tratamiento
H	tiempo de exposición	Dieta estandar	Dieta + colesterol	Ayuno	
08:00	11	0.256	--	--	0
12:00	3	0.279	0.319	0.282	4
15:00	6	0.248	0.308	0.336	7
23:00	2	0.288	0.261	0.295	15
08:00	11	0.309	0.339	0.281	24
12:00	3	0.284	0.311	0.270	28
15:00	6	0.296	0.315	0.277	31
23:00	2	0.328	0.358	0.287	39
$\bar{X} \pm S.E.M.$		0.286 \pm 0.009	0.316 \pm 0.011	0.290 \pm 0.008	
F			<0.10	<0.90	

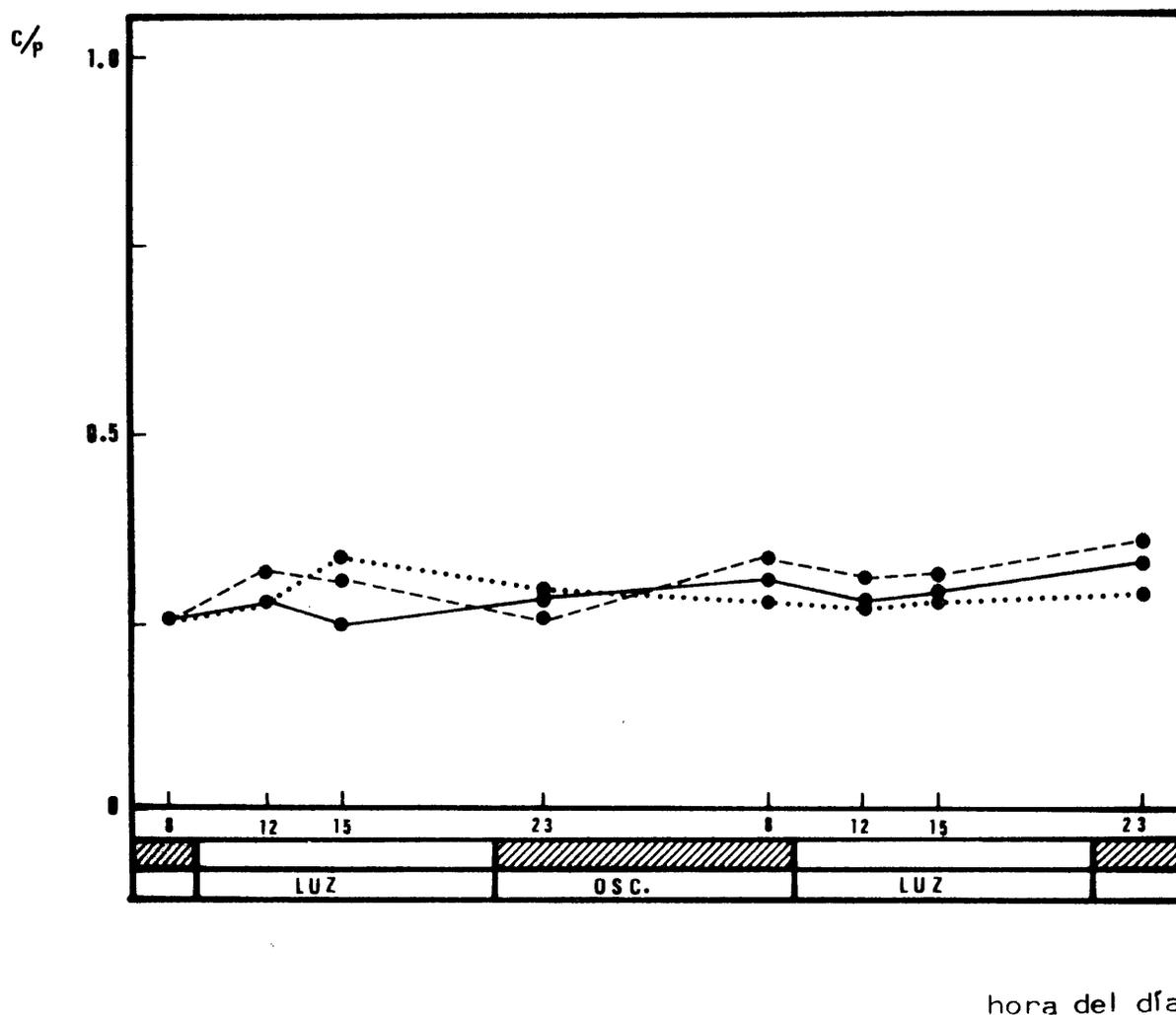


Fig. 41. _ Influencia del ayuno y de la suplementación de colesterol en la dieta sobre la fracción molar colesterol / fósforo lipídico en microsomas cerebrales (—) animales controles; (---) animales alimentados con dieta de colesterol; (.....) animales privados de alimento.

5. DISCUSSION

V. - DISCUSION

Caracterización de la HMG-CoA reductasa como enzima microsomal. -

Una de las características diferenciativas de las enzimas ligadas a membrana es su peculiar comportamiento en función de la temperatura. Las representaciones de Arrhenius, para este tipo de enzimas, muestran discontinuidades a las denominadas temperaturas de transición, por debajo de las cuales la energía de activación es mayor (186). El origen de estas discontinuidades es aún oscuro, aunque se han señalado al menos cuatro posibles razones: 1. Separaciones laterales de fase en el plano de membrana originadas por la cristalización de una fracción de lípidos de un elevado punto de fusión y que se segregarían en un plano separado. 2. Cambios en la bicapa capaces de modificar la accesibilidad de sustratos o cofactores, (variaciones de permeabilidad, por ejemplo). 3. Presencia de un "anillo" lipídico con diferentes propiedades del resto, susceptible de cambios térmicos que pueden alterar la conformación enzimática. 4. Finalmente, alteraciones conformacionales de las propias proteínas, dependientes de la temperatura y capaces de originar cambios de actividad y de afectar posiblemente el estado de los lípidos periféricos de la bicapa (187).

En nuestro caso, tanto la actividad HMG-CoA reductasa hepática como cerebral, muestran discontinuidades en sus representaciones de Arrhenius a los 26,3°C y los 22,4°C, respectivamente. En este sentido, Philippot y cols. (188) han encontrado recientemente un valor de 24,2°C para la enzima de linfocitos neoplásicos de cobaya L_2C . En otros estudios llevados a cabo en microsomas hepáticos de rata se señala un intervalo flanquea

do por dos discontinuidades a los 19°C y los 28°C (189). Nuestros datos son, por consiguiente, del orden de los encontrados para otros orígenes. La pequeña diferencia observada entre ambos órganos puede ser debida a la distinta composición lipídica, como se verá más adelante.

En ambos casos, las energías de activación son superiores para temperaturas situadas por debajo de la de transición y mayor en cerebro que en hígado (16,44 y 12,53 Kcal/mol, respectivamente), mientras que por encima de este punto, las energías de activación se hacen en ambos casos muy parecidas (7,49 y 7,93 Kcal/mol), lo que puede indicar menor dependencia del entorno una vez ocurrida la transición de fase lipídica. Indirectamente, este hecho constituye una prueba adicional de que el entorno lipídico debe poseer un efecto concreto sobre la actividad enzimática. En general estos valores son más bajos que los descritos para rata (189).

Habida cuenta de que el pollo es un animal especialmente apto para asimilar y acumular en sus tejidos el colesterol exógeno (144); de que la razón molar colesterol:fosfolípidos es el determinante más importante de la fluidez de las membranas biológicas (190) y que, posiblemente, la fluidez de la membrana microsomal sea un factor importante en el control "feedback" de la biosíntesis del colesterol (191), era presumible que la alimentación crónica con una dieta rica en colesterol pudiese inducir cambios fisico-químicos en el entorno lipídico de la HMG-CoA reductasa capaces de influir, de algún modo, sobre los parámetros indicados. Desafortunadamente la fuerte inhibición provocada en hígado por este tratamiento hizo imposible el cálculo de las energías de activación y de la temperatura de transición. En el cerebro, ninguno de estos parámetros se modifica ostensiblemente bajo análogas condiciones. No obstante, este órgano es, por excepción, bas-

tante reacio a acumular colesterol procedente de la dieta, tanto bajo tratamientos agudos (apartado 4.4.3.) como bajo tratamiento sostenidos durante semanas (192), lo que justifica la insensibilidad de los parámetros mencionados frente a las variaciones en el contenido de colesterol en la dieta.

Dentro del estudio del comportamiento de la enzima frente al calor, otro aspecto abordado ha sido el de su inactivación térmica. La preincubación de las suspensiones microsomales a temperaturas y tiempos crecientes provoca una pérdida de actividad paralela de la HMG-CoA reductasa hepática. Esta pérdida de actividad no revierte cuando se regresan los extractos a su temperatura habitual de mantenimiento a 4°C y origina perfiles que no se ajustan satisfactoriamente a cinéticas de primer orden. No se trata, por consiguiente, de un proceso exponencial simple. Este comportamiento no es extraño en absoluto. Yon ha señalado, sobre una amplia base experimental, que este tipo de fenómenos, común a muchas proteínas, es el resultado de una interacción compleja entre numerosos factores, dependientes, entre otras muchas cosas, del pH, fuerza iónica del medio, y del propio grado de purificación de la proteína, lo que los hace difícilmente accesibles al análisis (193), y que en nuestro caso tendría como factor adicional, la propia estructura de membrana que sustenta a la reductasa.

Una vez establecida la respuesta de la enzima frente a la temperatura y definidos los correspondientes parámetros básicos, se inició el estudio de la interacción de la HMG-CoA reductasa microsomal con la fracción citosólica celular. Como ya se ha reiterado, los fenómenos inicialmente descritos de activación-inactivación de la HMG-CoA reductasa por preincubación de los microsomas hepáticos (194, 195) hizo sospechar la existencia de un sistema soluble, de naturaleza proteica, capaz de modificar la capacidad catalítica

ca de esta enzima. Actualmente, estos hechos se interpretan asumiendo la existencia, en hígado de rata, de dos formas interconvertibles de HMG-CoA reductasa, cuyo equilibrio estaría regulado mediante un sistema citosólico fosforilasa-fosfatasa (183, 184).

En nuestro caso, los intentos realizados para poner de manifiesto la existencia de una actividad fosfatásica soluble en hígado de pollo han sido infructuosos. La preincubación de microsomas hepáticos con sobrenadante de $105000 \times g$ en presencia y ausencia de F^- (conocido inhibidor de las fosfatasas) no revela diferencias significativas de actividad. No obstante, la existencia de un tal sistema no puede descartarse por completo, ya que existen evidencias recientes de que la reductasa hepática de pollo es fuertemente inhibida (70%) por adición al medio de ATP y Mg^{2+} , cofactores necesarios para la actuación de las cinasas (196). Una posible interpretación de estos resultados sería que, bajo las condiciones habituales, un elevado porcentaje de la enzima estuviese en forma activa (defosforilada). Ello explicaría, de una parte, la aparente inoperancia de la fosfatasa que se desprende de nuestros resultados y de otra, la enérgica inhibición, supuestamente causada por una proteínasa, descrita por los mencionados autores.

Finalmente, dentro de este primer grupo de experiencias, se ha llevado a cabo la solubilización parcial de la HMG-CoA reductasa hepática. Mediante el procedimiento utilizado, se ha logrado un rendimiento del 48,7%, inferior al citado por algunos autores (197). La enzima solubilizada muestra una actividad específica menor que la inicial, entanto que la calculada para la fracción microsomal residual aumenta. Es plausible que ello se deba a la movilización de otras proteínas desde los microsomas al sobrenadante durante las operaciones de lavado que requiere el mencionado proce-

dimiento, hecho que explicaría también el ligero descenso de la actividad específica experimentado por la enzima solubilizada.

La HMG-CoA reductasa soluble manifestó una extrema sensibilidad a la temperatura, siendo la inactivación virtualmente completa por debajo de los 20°C-25°C, lo que imposibilitó cualquier tentativa de estudiar los parámetros térmicos bajo esta nueva situación. Esta inactivación por frío puede considerarse análoga a la descrita para la enzima de hígado de rata (198, 199, 200). En este origen, la reductasa solubilizada se inactiva reversiblemente para temperaturas inferiores a 19°C (201). Las causas y significados de este tipo de respuesta permanecen aún oscuras aunque parece deberse a cambios conformacionales que afectan su centro activo, más que a modificaciones en su estructura cuaternaria (disociación, por ejemplo), dado que durante el proceso el peso molecular no varía sensiblemente (198).

Evolución diurna

La existencia de un ritmo diurno de actividad HMG-CoA reductasa hepática e intestinal ha sido suficientemente constatada en rata y otros orígenes próximos de hábitos nocturnos (157, 170, 202, 203). En ellos, el máximo tiene lugar hacia la mitad del periodo oscuro, tiempo durante el cual estos animales ingieren su alimento. Como ya se vió en la primera parte de este trabajo, existen pruebas que parecen sustentar una vinculación muy estrecha entre el aporte de alimento y el máximo de actividad diurna (169, 204). Por ello era de interés estudiar la posible existencia de un tal ritmo en pollo, animales que realizan la mayor parte de la ingesta durante el día.

Nuestros resultados ponen de manifiesto, en primer lugar, la existencia de variaciones rítmicas a lo largo del día en la enzima de hígado. Estas variaciones presentan un perfil bastante simétrico y opuesto al exhibido por la enzima de hígado de rata (159, 202), confirmándose la relación antes mencionada entre alimentación y actividad de reductasa. En pollos de nueve días, la actividad máxima es 2,83 veces mayor que la mínima, relación bastante inferior a la descrita para ratas adultas (141) pero similar a la que exhibe este animal durante las primeras semanas de vida (205).

Para que una enzima pueda considerarse involucrada en la regulación de la ruta metabólica en la que participa, uno de los requisitos indispensables que deben concurrir es que catalice una etapa que sea limitante, al menos bajo las situaciones en que deba ejercer la regulación. Tan solo cuando esto ocurre, un aumento o una disminución de la actividad de la enzima se traducirá en un aumento o una disminución de la velocidad global de la ruta. Desde este punto de vista, un buen índice de que, como en rata, la HMG-CoA reductasa de pollo desempeña un papel central en la ruta biosintética del colesterol, sería que la velocidad de incorporación de precursores radiactivos acusara, en primer lugar, las variaciones diurnas encontradas, y en segundo lugar, que respondiera de forma análoga a como lo hace la enzima a los cambios en la alimentación, como se verá más adelante.

En efecto, la incorporación de acetato a lípidos insaponificables por cortes de hígado mostró, a lo largo del día, claras variaciones rítmicas que dieron lugar a perfiles semejantes a los exhibidos por la reductasa. Si se comparan las actividades enzimáticas totales del hígado con las correspondientes velocidades de incorporación de acetato, en el cenit y en el nadir, se encuentran diferencias obviamente debidas a que en el primer caso

se trabaja "in vitro" en presencia de concentraciones de sustrato muy superiores a las intracelulares mientras que en el segundo caso las condiciones son bastante más próximas a las habituales en el animal intacto. No obstante, dando por supuesta la validez de ambos planteamientos, las variaciones relativas observadas deben responder de algún modo, a las variaciones reales y han de ser por tanto tenidas en cuenta. En este sentido, es llamativo el hecho de que mientras la actividad reductasa es en el cenit de dos a tres veces la del nadir, la máxima velocidad de incorporación de acetato es casi nueve veces mayor que la mínima registrada.

En la rata, también se ha encontrado una falta similar de correlación entre ambos parámetros, aunque en sentido inverso. Shama Bhat y Subba Rao (171) han interpretado estos hechos postulando la existencia de otro paso posterior a la reductasa que se hace limitante durante parte del ciclo. Se ha señalado como posible candidato la PPMVA-descarboxilasa y se ha supuesto que esta enzima también podría sufrir cambios rítmicos de actividad (171). Los datos sin embargo, son contradictorios: mientras que, a tenor de los primeros planteamientos experimentales, la incorporación de ^{14}C -MVA a colesterol no mostraba variaciones diurnas de velocidad (168, 206), los autores antes mencionados han señalado que cuando se incorporan cantidades de MVA suficientemente pequeñas, se presenta un ritmo diurno con un incremento en el cenit de tres veces la velocidad del nadir, que según ellos es atribuible a la PPMVA-descarboxilasa (171). En contraposición con esto hay que añadir que existen también evidencias muy recientes que niegan la existencia de variaciones rítmicas en la actividad de esta enzima, medida "in vitro" (158).

Estos hechos podrían interpretarse alternativamente, sobre la base de que el punto de regulación posterior a la HMG-CoA reductasa,

presumiblemente la PPMVA-descarboxilasa, sea capaz de exhibir una cinética sigmoidea frente a su sustrato, de tal modo que descensos de dos a tres veces en el aporte de éste, originen caídas de actividad mucho mayores. En estas condiciones, tal enzima se convertiría en la etapa limitante de una parte del ciclo, y los intermediarios posteriores a este punto causarían cambios de concentración bastante superiores a los atribuibles exclusivamente a la acción de la reductasa. Si esta hipótesis es correcta, tan solo la incorporación de cantidades relativamente pequeñas de MVA frente al "pool" intracelular de este metabolito mostraría variaciones rítmicas, ya que cantidades mayores forzarían la ruta, enmascarando el fenómeno. También quedaría justificada la ausencia de variaciones diurnas en la actividad PPMVA-descarboxilasa medida "in vitro", ya que sus efectos se deberían exclusivamente a cambios en la capacidad catalítica originados por las variaciones en la concentración de sustrato y no a cambios en la actividad específica o en la cantidad de enzima. Según este esquema, el ritmo diurno de la síntesis del colesterol en el hígado sería el resultado de la interacción entre la cinética de la HMG-CoA reductasa, única enzima verdaderamente modulada en función de la hora del día y otra, presumiblemente la PPMVA-descarboxilasa, que actuaría como un amplificador de la señal generada por aquella y que tendría en el caso de la rata un factor de ganancia menor que la unidad, mientras que en el pollo, al menos durante las primeras semanas de vida, este factor de ganancia sería mayor que la unidad.

En asa duodena!, la HMG-CoA reductasa también presenta variaciones rítmicas a lo largo del día, en fase con las hepáticas, durante las cuales la actividad aumenta, como en aquel caso, de dos a tres veces aunque sus valores absolutos son muy inferiores. Estos cambios son manifiestamente paralelos a los habidos en la incorporación de acetato a lípidos insaponifi-

cables por fragmentos de este órgano, no solo en cuanto al perfil se refiere, sino asimismo en cuanto al cociente entre los valores máximos y mínimos que también en este caso es algo mayor que dos. En la rata se sabe que la biosíntesis intestinal de colesterol está sujeta a cambios diurnos (207) asociados con modificaciones paralelas de la actividad HMG-CoA reductasa (192). Estos cambios son de menor magnitud que los sufridos por la enzima hepática de animales adultos, aunque similares a los presentados en este órgano durante la lactancia (205), lo que representa un nuevo punto de coincidencia.

Por su parte, la reductasa de cerebro no presentó variaciones importantes a lo largo del día. Establecida la vinculación existente entre estas variaciones y la alimentación, la ausencia de ritmo en cerebro no resulta inesperada, viniendo a corroborar la independencia metabólica de este órgano frente a las vicisitudes de la ingesta en lo que a biosíntesis de colesterol se refiere.

Queda confirmado, pues, que el comportamiento de la reductasa de los diferentes órganos estudiados es distinto y está en íntima conexión con las peculiaridades fisiológicas de los respectivos tejidos y sin perjuicio desde luego de que la enzima pueda ser la misma en todos ellos. De hecho, recientemente se ha sugerido que las reductasas hepática e intestinal podrían ser estructuralmente idénticas (208), dado que ambas poseen cinéticas similares (209) y dan reacciones cruzadas frente a antisueros dirigidos contra una de ellas (210). De ser así, las diferencias observadas deben ser atribuidas al entorno que rodea a la enzima en cada uno de los tejidos mencionados.

Una cuestión importante que puede plantearse acerca de las variaciones rítmicas exhibidas por la enzima es la de su aparición durante el desarrollo. En la rata se ha señalado que el ritmo en lactantes es de menor magnitud y además está invertido, respecto al de adultos, inversión que ha sido explicada sobre la base de que las ratas lactantes realizan la mayor parte de la ingesta durante el día (205). En pollo, durante la primera semana de vida tiene lugar la involución total del saco vitelino y el consiguiente agotamiento de las reservas de origen "materno", lo que significa que a partir de este momento la nutrición va a tener lugar a través de la ingesta, exclusivamente. Por otra parte, estos animales ingieren alimento del exterior ya desde el primer día. Ambos hechos sugieren la existencia de tres etapas nutricionales diferentes:

1. - Una etapa anterior a la eclosión en que el animal se nutre exclusivamente de los compuestos contenidos en el huevo a tal efecto.

2. - Una segunda etapa de nutrición mixta que tiene lugar durante los primeros días de vida autónoma, en que una parte de los recursos procede aún del saco vitelino y otra procede de la ingesta.

3. - Finalmente, una tercera etapa en que una vez reabsorbido completamente el saco vitelino, la nutrición se lleva a cabo solamente a partir de los recursos de la dieta.

De otra parte, investigaciones llevadas a cabo en nuestro Departamento (192) han demostrado que el tránsito entre la segunda y tercera etapas tiene una repercusión extraordinaria en la biosíntesis hepática e intestinal de colesterol y, paralelamente, en las respectivas actividades

HMG-CoA reductasa. Pareció, por consiguiente, de gran interés estudiar si los ritmos diurnos presentados por esta enzima en ambos órganos preexisten cuando tiene lugar la eclosión o por el contrario se generan durante la primera etapa del desarrollo postnatal, verosímilmente, como respuesta al cambio del modo de nutrición fetal al modo de nutrición adulta.

Nuestros resultados muestran que tanto en hígado como en asa duodenal, el ritmo surge durante la primera semana de vida y que, en ambos casos, la amplitud crece progresivamente hasta el décimo día, para estabilizarse después. En el día cuatro, en que la involución del saco vitelino no es todavía completa, la amplitud del ritmo hepático es prácticamente despreciable, creciendo a partir de entonces rápidamente y estabilizándose luego entre los días 10 y 14. Esta evolución es paralela a la que se observa en la actividad reductasa (192). Cuando se considera el órgano completo, la amplitud del ritmo describe un perfil semejante, aunque su tendencia a estabilizarse después del décimo día es menor.

En el duodeno las cosas suceden de manera diferente: mientras que en el hígado, la amplitud del ritmo en el día cuatro es 55 veces menor que la del día 14, en asa duodenal es sólo una tercera parte. Debido a esto, el incremento en la variación diurna que tiene lugar hasta su estabilización es bastante menos importante que el que experimenta la reductasa hepática.

Estos hechos indican que, en efecto, la propia generación del ritmo diurno está vinculada estrechamente al cambio de nutrición que tiene lugar después de la eclosión, y que la creciente demanda corporal de colesterol, una vez reabsorbido completamente el saco vitelino, es cubierta

por el hígado no solamente incrementando fuertemente la actividad específica de la HMG-CoA reductasa (192), sino elevando además los niveles máximos de actividad diurna. El intestino, por su parte sería el órgano más rápido en responder al cambio de nutrición mostrando ya desde el cuarto día un patrón diurno de comportamiento próximo al definitivo.

Efecto de la alimentación.

Como ya se ha reiterado, la inhibición de la colesterogénesis hepática que tiene lugar a nivel de la HMG-CoA reductasa cuando se alimentan ratas con dietas ricas en colesterol es un hecho sabido desde hace tiempo (152). Sin embargo el conocimiento de los efectos que sobre los distintos parámetros del ritmo posee dicho tratamiento es parcial y mucho más reciente (87). Sobre la respuesta en otros animales, así como sobre la colesterogénesis extrahepática, la información al respecto es prácticamente nula. Consideramos, sin embargo, que este tipo de estudio es imprescindible para comprender los mecanismos que subyacen al fenómeno, y tal como se mencionó en la introducción de este trabajo, entendemos que el pollo puede ser un buen modelo para abordar el problema habida cuenta de que parece tener gran capacidad para asimilar y acumular en sus tejidos el colesterol de la dieta (144). El ayuno es otro factor igualmente capaz de disminuir la colesterogénesis hepática en la rata, aunque tanto su incidencia en el ritmo como los mecanismos implicados son peor conocidos.

Por todo ello, una vez delimitado el patrón diurno de la biosíntesis de colesterol y el de la reductasa, su enzima limitante, hemos estudiado el efecto que sobre tales parámetros tienen estas dos situaciones nutricionales

tipo: la alimentación con una dieta rica en colesterol y el ayuno.

Antes de analizar los resultados obtenidos, debe señalarse que la existencia de una reserva de alimento en el buche de estos animales puede constituir un factor de incertidumbre a la hora de establecer el verdadero comienzo del tratamiento aplicado. Para obviar este problema se hizo aconsejable iniciar los mencionados tratamientos una hora antes del comienzo del periodo luminoso del ciclo con objeto de permitir que las reservas se agotasen por completo, y al mismo tiempo tener ciertas garantías de que aún no se había iniciado la siguiente ingesta. De hecho en los animales examinados al comienzo de la fase luminosa, el contenido del buche era nulo o muy escaso. No puede descartarse, sin embargo, que este reservorio pueda ser el causante, por ejemplo, del esbozo de ritmo bifásico observado en el duodeno en alguna de las experiencias, dada la gran sensibilidad a la ingesta que este órgano parece tener.

La sustitución de la dieta por otra enriquecida con colesterol al 5 % origina en la HMG-CoA reductasa hepática un violento descenso de la actividad que se inicia a partir de las tres horas del comienzo del tratamiento. La enzima duodenal muestra un efecto análogo aunque más rápido, de tal modo que a las tres horas del cambio de dieta (dos, del comienzo de la etapa luminosa), la inhibición alcanza el 64 %. Tanto los niveles basales como las amplitudes, en ambos casos, resultan afectadas por esta inhibición, pero es de destacar que ambos parámetros descienden más acusadamente en la enzima hepática. Puede verse asimismo que el porcentaje de inhibición en el cenit del segundo día es mucho mayor en hígado que en asa duodenal.

Si se comparan estos hechos con las velocidades de incorporación de acetato a lípidos insaponificables en ambos tejidos, se observa que la suplementación de colesterol a la dieta modifica los perfiles controlados de forma muy similar a la vista para la reductasa, confirmando, una vez más, su carácter limitante de la ruta. En este caso, el efecto es también mucho más acusado en hígado que en intestino, ya que en el primero de los órganos mencionados, tanto la velocidad de incorporación como sus variaciones diurnas residuales son menores que en el asa duodenal, órgano en que sigue existiendo un ritmo francamente patente. Así, por ejemplo, mientras que en hígado, la amplitud del ritmo residual de incorporación es en el segundo día el 10 %, aproximadamente, de la control, en duodeno dicha amplitud persiste en un 76 %. Análogamente, la velocidad máxima en hígado, durante el segundo día de tratamiento es también del orden del 10 % de la registrada en pollos alimentados con dieta estandar en tanto que en asa duodenal se conserva aún el 56 %. Otro aspecto de coincidencia con los cambios sufridos por la HMG-CoA reductasa lo constituye la rapidez de la respuesta. Mientras la incorporación de acetato por asa duodenal disminuye claramente a las tres horas de tratamiento con colesterol, en ese tiempo la incorporación en hígado casi permanece constante, aunque a la larga, sea el intestino el menos afectado.

De todos estos datos se desprende que las variaciones diurnas de la reductasa hepática, y consiguientemente de la colesterogénesis hepática, son más sensibles al colesterol presente en la dieta, aunque su respuesta es más lenta que la duodenal. Esta mayor sensibilidad frente al colesterol de la dieta estaría de acuerdo con la opinión generalizada de que el hígado es el principal órgano en que la biosíntesis de colesterol viene regulada por este producto final (30, 47), siendo la colesterogénesis intestinal

menos afectada por este tipo de tratamiento, hasta el punto de asumir en estas condiciones, según algunos autores, el papel principal en la síntesis endógena de esteroides (28).

Se ha investigado también el efecto que tiene el colesterol de la dieta sobre la ontogenia del ritmo diurno en ambos órganos. Cabe decir al respecto que la alimentación de pollos, desde el día de la eclosión, con una dieta que contenga un 2 % de colesterol, anula virtualmente la actividad HMG-CoA reductasa hepática y duodenal, impidiendo los incrementos que tienen lugar normalmente durante la primera semana de vida. Huelga decir, por tanto, que las variaciones diurnas son igualmente abolidas bajo este tratamiento.

Por último es de destacar que la actividad HMG-CoA reductasa de cerebro no se ve afectada por el colesterol suplementado a la dieta, ni en su actividad específica, ni en las variaciones que puede sufrir a lo largo del día. Este hecho, unido a que su contribución es prácticamente constante a lo largo de las dos primeras semanas de vida y que el ayuno también carece de influencia en lo que a la mencionada enzima se refiere testimonia que la colesterogénesis en este órgano, así como sus mecanismos de regulación son completamente independientes de la ingesta, y desde luego diferentes a los que actúan sobre otros órganos como pueden ser el hígado y el asa duodenal.

El efecto del ayuno sobre la actividad diurna de la HMG-CoA reductasa hepática y duodenal es igualmente drástico. En hígado se observa una clara disminución de la actividad que afecta tanto a los niveles basales como a la amplitud del ritmo. El efecto es más rápido que el manifestado con

la dieta de colesterol, aunque los niveles residuales de actividad permanecen más elevados que en aquel caso. Durante el segundo ciclo se esboza, como entonces, una ligera variación diurna. En duodeno, la respuesta inicial es más rápida y más violenta aún, para adoptar luego, durante el segundo día, un perfil similar al causado por el colesterol de la dieta con un leve indicio de ritmo. Por lo demás la intensidad de la respuesta es similar a la mostrada por el hígado.

La incorporación de acetato acusa igualmente el descenso experimentado por la reductasa en ambos órganos pero reviste algunas peculiaridades dignas de mención. En el caso del hígado la velocidad de incorporación parece verse más afectada que la propia reductasa: la abolición del ritmo es prácticamente completa quedando un valor residual que desciende lentamente hasta hacerse casi imperceptible hacia el final del segundo ciclo. No obstante ello no significa necesariamente que el mecanismo biosintético se haya visto afectado de igual manera, sino simplemente que bajo estas condiciones el acetato puede haber sido desviado a otras rutas metabólicas por requerimientos energéticos o de otro tipo. En asa duodenal, sin embargo, esto no ocurre. En su conjunto, la velocidad de incorporación bajo los efectos del ayuno parece menos afectada, originando un perfil que, aunque algo más bajo, recuerda al obtenido con la dieta de colesterol. En esencia, las oscilaciones diurnas permanecen, aunque como los niveles basales, son sensiblemente menores que los controles.

Finalmente cabe destacar que también el asa duodenal reacciona más rápidamente que el hígado frente al ayuno. Al cabo de tres horas de falta de alimento la actividad reductasa intestinal disminuye marcadamente, mientras que la hepática apenas modifica su nivel. De la misma manera, la

incorporación de acetato por fragmentos de asa duodenal desciende significativamente durante ese mismo intervalo, en tanto que los cortes hepáticos no manifiestan esta tendencia.

La enzima de cerebro, una vez más, se muestra insensible al tratamiento, al menos durante las primeras cuarenta y ocho horas que suceden a la retirada de alimento. Ello corrobora lo expresado anteriormente acerca de los diferentes mecanismos de regulación de la actividad reductasa en este órgano.

Cambios en la composición microsomal

Otros de los objetivos propuestos al comienzo de este trabajo era el de estudiar las repercusiones de los cambios de alimentación sobre la composición lipídica de las membranas microsomales en que se aloja la HMG-CoA reductasa. Como también se ha apuntado ya, la razón de este estudio era la de observar si existen correlaciones entre los cambios eventualmente observados y las variaciones experimentadas por la HMG-CoA reductasa. Con esta finalidad hemos determinado sistemáticamente en dicha fracción el contenido en colesterol y fosfolípidos en animales sujetos a dieta estandar y durante las cuarenta y ocho horas siguientes a los habituales tratamientos de dieta rica en colesterol y ayuno.

De los valores obtenidos para los animales controles alimentados "ad libitum" con una dieta comercial equilibrada destaca, en primer lugar, que ninguno de los componentes estudiados muestra variaciones diurnas de concentración, incluidos el colesterol total, libre y esterificado. En

rata se sabe que ni las concentraciones de colesterol microsomal (211), ni incluso los niveles plasmáticos de colesterol se modifican prácticamente durante el día (211). Resulta paradójico que siendo la colesterogénesis un proceso fundamentalmente rítmico, ninguno de estos niveles acusa modificaciones detectables. Parece que ello puede deberse a variaciones paralelas del "turnover" del colesterol, aunque sobre este punto es muy poco lo que se conoce (211). En pollos alimentados normalmente, el cerebro es, de los tres órganos estudiados, el que posee mayor nivel de colesterol microsomal. En todos ellos la proporción de los ésteres de colesterol es netamente menor que la de colesterol libre, situándose entre el 15 y el 20 %.

La concentración de fósforo lipídico total es igualmente mayor en microsomas de cerebro y prácticamente igual en microsomas hepáticos y duodenales. El resultado de ello es una relación molar colesterol: fósforo lipídico del orden de 0.3, muy similar en los tres órganos, si bien, en tubo digestivo es algo mayor. No debe olvidarse, sin embargo, que cuantitativamente, una parte importante del tejido analizado en el caso del asa duodenal es realmente tejido muscular, para el que se ha calculado en embrión de pollo una relación C/P netamente mayor (de 0.4 a 0.5) (212). Por consiguiente el valor ligeramente alto encontrado por nosotros puede atribuirse realmente a la particular composición tisular de este órgano. Casi todo el contenido en fósforo lipídico se debe a la aportación de cuatro fosfolípidos: esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. De ellos, el más abundante en los tres órganos es la fosfatidilcolina, seguida de la fosfatidiletanolamina. Juntos representan entre el 80 y 90 por ciento del total. El menos frecuente es el fosfatidilinositol, que contribuye con un 5 % aproximadamente.

La alimentación con una dieta suplementada con colesterol al 5 %, provoca importantes cambios en la composición lipídica de los microsomas hepáticos. En primer lugar, el colesterol total sufre un incremento, debido principalmente al aumento de la fracción esterificada, y que se manifiesta claramente a partir de las tres horas del comienzo del tratamiento. Los aumentos del contenido en colesterol microsomal inducidos por la presencia de esta sustancia en la dieta son conocidos en rata (213); no obstante, estos efectos no son tan rápidos como los descritos por nosotros, lo que viene a confirmar de nuevo las peculiaridades distintivas entre ambos orígenes, rata y pollo, en lo que se refiere a la capacidad de asimilación y acúmulo de colesterol. En este sentido, algunos autores han encontrado que alimentando pollos con una dieta suplementada con un 1 % de colesterol, la concentración hepática de este compuesto se incrementa unas diez veces (214). En cuanto al incremento del porcentaje de los ésteres frente a la forma libre, se ha comprobado que el colesterol esterificado se incorpora más rápidamente que el libre a células en cultivo y es más efectivo que éste en incrementar la rigidez de las membranas (215). Este hecho podría deberse a que la unión de los ésteres con las membranas parece ser más estable, en tanto que el colesterol libre puede ser fácilmente liberado (216).

El segundo efecto importante que provoca el colesterol de la dieta con los microsomas hepáticos de pollo es un descenso de los niveles de fósforo lipídico total, más rápido aún que el del colesterol, que afecta a todos los fosfolípidos estudiados pero que, en valor absoluto, se debe sobre todo a la fosfatidilcolina. Un descenso similar de fosfolípidos hepáticos se ha mencionado también en pollo, varias semanas después de ser alimentados con una dieta de colesterol al 1 % (214).

Ambos efectos, el aumento de colesterol y la disminución de fósforo total contribuyen a que la razón molar colesterol/fósforo lipídico experimenta un incremento excepcionalmente rápido e intenso que tan solo tres horas después del comienzo del tratamiento, es ya del 240 %. Asumiendo que este cociente es un factor determinante del grado de fluidez de la membrana (190), se sigue que la alimentación con una dieta rica en colesterol provoca un violento descenso en la fluidez de las membranas microsomales hepáticas.

Bajo este mismo tratamiento, no se ha detectado cambios importantes en la composición lipídica de los microsomas de asa duodenal. Ni el contenido en colesterol, ni el contenido en fosfolípidos muestran variaciones detectables, por lo que tampoco su razón molar se modifica aparentemente. No obstante, como ya se ha mencionado, los microsomas analizados de este órgano proceden, en buena parte, de células musculares y de otro tipo, en que la colesterogénesis, y por tanto la actividad HMG-CoA reductasa es insignificante. No puede descartarse por lo tanto que el colesterol de la dieta tenga efectos análogos a los descritos para el hígado pero localizados en las células microsomales colesterogénicamente activas, efectos que hubiesen quedado evidentemente enmascarados. Con los datos de que se dispone no es posible aventurar ninguna conclusión en este sentido.

En microsomas de cerebro tampoco se producen modificaciones importantes en su composición, como consecuencia de ingestas elevadas de colesterol como las ensayadas.

Finalmente, el ayuno durante dos días consecutivos no lleva consigo cambios importantes en ninguno de los parámetros medidos de

microsomias hepáticos. En microsomias duodenales, la incidencia del ayuno es también escasa. A pesar de ello durante el segundo ciclo se detecta un ligero incremento en la concentración de colesterol respecto de las proteínas microsomiales, que es la causa de una modificación paralela en la relación molar C/P. Es concebible que pasadas las primeras quince o veinte horas de ayuno, que dada la corta edad de los pollos supone un periodo de inanición relativamente importante, tenga lugar una movilización generalizada de aquellas moléculas que, como fosfolípidos y proteínas, puedan ser degradadas con fines energéticos. Es concebible también que los tejidos musculares sean en ese caso uno de los mas afectados por esta movilización. En este sentido cabe decir que los animales sacrificados durante el segundo día de ayuno, mostraban una regresión muy evidente de la musculatura pectoral y del propio grosor del tracto duodenal. Si los hechos tuviesen lugar de esta manera, sería justificable que la concentración de colesterol relativa a proteínas aumentara aparentemente, en tanto que la concentración relativa de fosfolípidos se mantuviese más o menos constante sin que ello implicara necesariamente que el ayuno provoque una alteración local de la fluidez de la membrana en las células luminales que sintetizan esteroides activamente. Para aclarar este punto nuevamente serían necesarios datos más concretos sobre la mucosa duodenal.

En el cerebro, la influencia del ayuno puede cifrarse en descensos ligeros y paralelos del contenido microsomal de colesterol y fosfolípidos que no acarrearán modificación alguna de la relación molar C/P. En la misma línea argumental, sugerida para el duodeno, estos cambios pueden interpretarse sobre la base de reajustes metabólicos con fines energéticos, generales por la inanición. En apoyo de esta hipótesis, Reddy y cols. (217) han comprobado que en ratas jóvenes desnutridas, el contenido cerebral en

colesterol y fosfolípidos desciende, en tanto que la velocidad de incorporación de ^{32}P a fosfolípidos por homogenados de este órgano sufre un incremento del 30 % aproximadamente, lo que sugiere que realmente el mecanismo de estos compuestos se acelera como respuesta a la limitación de recursos nutritivos exógenos.

Consideraciones finales sobre los mecanismos implicados

Está suficientemente demostrado que las variaciones diurnas de la HMG-CoA reductasa son consecuencia, al menos en hígado, de cambios en la cantidad de enzima presente y no de cambios en su actividad catalítica (218). El rápido "turnover" que presenta esta enzima es un hecho sobradamente conocido (169) siendo la actividad mostrada en un momento dado el resultado del equilibrio entre las velocidades de síntesis y degradación. Dado que numerosos datos cinéticos e isotópicos sugieren que la velocidad de degradación de la reductasa permanece esencialmente constante a lo largo del día (159), hoy se piensa que el ritmo hepático sería la consecuencia de variaciones en la velocidad de síntesis de esta enzima, igualmente rítmicas.

Reiteradamente se ha venido afirmando, por otra parte, que tanto el colesterol presente en la dieta como en el ayuno inhiben la síntesis de colesterol endógeno actuando igualmente sobre la cantidad de enzima presente (219), y más concretamente sobre su velocidad de síntesis (159). Estos hechos parecen estar suficientemente demostrados. Que el colesterol puede estar directamente implicado en los mecanismos nucleares de control que afectan a la síntesis de la reductasa, se desprende de los trabajos llevados a cabo por Gould y cols (220). Estos autores han demostrado que existe una determinada cantidad de colesterol ligado a la cromatina que podría desempeñar un papel regulador importante según ellos, dado que los aumentos diurnos de actividad reductasa, están asociados con incrementos del colesterol libre unido a esta fracción; incremento que no tiene lugar a nivel microsomal.

No obstante, a raíz de las consideraciones sobre la vida media de la enzima hepática y sobre su velocidad de respuesta al ayuno o al

colesterol de la dieta que se hacen a continuación, en nuestro caso, la sola presencia de este tipo de control a nivel de síntesis proteica pudiera no ser suficiente para explicar los efectos obtenidos.

La vida media de la reductasa, entendida como el periodo de tiempo necesario para que la cantidad de enzima presente se reduzca a la mitad como consecuencia de la degradación, puede ser estimada por varios métodos (169, 218). Una de estas posibilidades parte de la consideración de que en el tramo descendente del ciclo diurno de actividad la velocidad de síntesis de enzima es muy pequeña frente a la de degradación siendo este último proceso, por consiguiente, el que condiciona fundamentalmente la forma de la curva en esta zona. Si se desprecia, pues, la influencia de la síntesis y suponiendo que la degradación de la enzima se lleva a cabo mediante un proceso exponencial de primer orden, en que la concentración C de enzima presente, en términos de actividad específica, viene dada por una expresión del tipo:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_1 t}$$

donde K_1 es la constante global de degradación, C_0 la concentración inicial de enzima presente (igualmente en términos de actividad específica) y t el tiempo, se tiene que, tomando logaritmos:

$$\ln C = \ln C_0 - K_1 t$$

Por consiguiente, si el modelo es aceptable, la representación de $\ln C$ frente al tiempo dará una recta de pendiente igual a K_1 . Debe indicarse, no obstante, que este tipo de artificios carece de fundamentos teóricos sólidos, por lo que las cifras dadas a continuación, como las calculadas en rata, tienen tan solo un valor indicativo.

En nuestro caso, tomando los datos de la tabla 7, y considerando arbitrariamente $t_0 = 16:00$ horas, se obtiene un buen ajuste, con coeficiente de correlación $|r| = 0.99$.

A partir de esta recta, se obtiene un valor $K_1 = 0.1$. Definiendo la vida media como:

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{K_1}$$

se obtiene para la enzima hepática un valor de 6.9 horas. Este valor es más alto que los calculados por diversos procedimientos para la reductasa hepática de rata que, aunque varía según los autores, se sitúan en torno a 4 horas (219). No obstante, los perfiles de actividad diurna encontrados para la enzima de rata son bastante menos abiertos que los encontrados por nosotros en pollo, lo que justificaría estas diferencias.

Si consideramos válido este valor de 6.9, esto querría decir que, supuesto un efecto inmediato del colesterol de la dieta o del ayuno y una acción exclusiva a nivel de síntesis de la enzima, la actividad puede, como máximo, reducirse a la mitad cada 6.9 horas. Puede comprobarse sin embargo que los descensos de actividad habidos en ambos casos son demasiado rápidos para ser compatibles con un mecanismo exclusivo de represión de la síntesis de reductasa. Si estos cálculos son correctos, se sigue que deben existir otros mecanismos a corto plazo que justifiquen dichos descensos de actividad. Recientemente, Mitropoulos y cols. han hecho argumentación semejante en rata, llegando a deducciones análogas (189).

Dado que el ritmo en asa duodenal presenta una forma más irregular, no ha sido posible establecer la vida media de la HMG-CoA reduc-

tasa en este tejido, aunque es presumible que sea del mismo orden que la encontrada para el hígado, dadas las afinidades existentes entre ambas enzimas (209) y como se desprende del paralelismo encontrado entre sus ritmos diurnos. Puesto que las respuestas encontradas en duodeno frente al ayuno y frente a la dieta de colesterol son aún más rápidas que las experimentadas por el hígado, puede suponerse que las deducciones hechas anteriormente sean aplicables también a la enzima de asa duodenal.

En esta línea argumental, existen evidencias muy recientes de que, tras un aporte extra de colesterol exógeno, ocurren cambios que, mientras para unos son de tipo fisicoquímico y estarían asociados a modificaciones de la fluidez de las membranas microsomales, capaces de modificar decisivamente la actividad reductasa (191) para otros supondrían variaciones en el "pool" de colesterol microsomal accesible a la enzima, con iguales efectos. Cambios que, en opinión de algunos autores podrían correlacionarse con el incremento de colesterol esterificado en los lugares donde se localiza la HMG-CoA reductasa (189). En cualquiera de los dos casos se proporciona una explicación plausible de los fenómenos observados por otros grupos en rata (189) y por nosotros, ahora, en el pollo, y que supondría la existencia de un mecanismo, a corto plazo, de regulación a nivel de membrana, responsable de la respuesta inicial a los cambios de colesterol en la dieta, y otro, a más largo plazo, que implicaría una represión de la síntesis de la HMG-CoA reductasa seguida, posiblemente de la de las restantes enzimas de la ruta (159).

En relación con este planteamiento, cabe decir que nuestros resultados son compatibles, en el caso del hígado, con tal mecanismo, dado que se observa un drástico descenso en la fluidez de la membrana, debido en

gran parte, al colesterol esterificado presente en los microsomas. Aunque este efecto no se ha visto en duodeno no puede descartarse su existencia, ya que una parte importante del tejido analizado es de origen muscular, y los cambios en la composición real de la mucosa, responsable casi exclusiva de la actividad reductasa detectada, pueden quedar totalmente enmascarados.

El efecto del ayuno, sin embargo, no parece residir en modificaciones de la composición de las membranas microsomales que sean fácilmente asociables a los cambios de actividad reductasa y de síntesis de lípidos insaponificables. Para algunos autores (221) los efectos observados en estos parámetros tras la privación de alimento habría que enmarcarlos en el reajuste hormonal que tiene lugar en estas condiciones y que lleva consigo, fundamentalmente, la caída de los niveles de insulina, necesaria para que tenga lugar el pico de actividad diurna (159) y el aumento de los niveles de glucagon, hidrocortisona y c-AMP todos ellos inhibidores de la reductasa (159).

A raíz de las consideraciones realizadas anteriormente sobre la vida media de la enzima y la rapidez de la respuesta, parte al menos de estos efectos deberían ser directos sobre la propia proteína enzimática. Resulta atractiva la idea de poder asociar a la cascada de reacciones de fosforilación-desfosforilación que se postula para la HMG-CoA reductasa, la existencia de una acción similar a la que tiene la insulina sobre la glucogeno sintetasa, induciendo la conversión de su forma inactiva en forma activa. No obstante, recientemente Dietschy y cols han presentado evidencia de que la modificación covalente no parece ser el mecanismo por el que actuaría el ayuno (219), por lo que este punto permanece aún oscuro.

6. CONCLUSIONES

1.- Se ha caracterizado la HMG-CoA reductasa como enzima ligada a membranas microsomales, habiéndose calculado las temperaturas de transición y las energías de activación para las enzimas de hígado y cerebro. La suplementación de colesterol a la dieta desde la eclosión no modifica ambos parámetros en el caso de la enzima de cerebro. La actividad en hígado queda anulada por este tratamiento. Asimismo, se ha estudiado la inactivación térmica de la enzima a 30, 50 y 70°C.

2.- La incubación a 37°C de suspensiones microsomales con sobrenadantes de 105.000 x g solo origina una muy ligera activación independiente de la presencia o ausencia de ion F^- , lo cual indica que, al menos en nuestras condiciones experimentales, no es activa la fosfatasa postulada en otros orígenes para la activación de la HMG-CoA reductasa. La congelación y descongelación de los microsomas solo origina un 50 % de solubilización de la enzima, con una actividad específica inferior a la inicial.

3.- Se han estudiado las variaciones a lo largo del día en la actividad reductasa de hígado, asa duodenal y cerebro de pollos recién nacidos. La actividad hepática de animales de 9 días muestra claramente un ritmo diurno en cuyo cénit, situado en la mitad de la fase luminosa, la actividad es 2.83 veces la actividad del nadir, situado en la mitad de la fase oscura. Este ritmo diurno es inverso al descrito en rata. La enzima de asa duodenal de pollos de 9 días presenta variaciones diurnas semejantes a las observadas en hígado. La enzima de cerebro de pollos de 6 días no muestra variaciones significativas en función de la hora del día.

4.- El ritmo diurno de las actividades hepáticas y duodenal aparece, durante la primera semana del desarrollo postnatal, incrementándose su amplitud hasta alcanzar un valor aproximadamente constante hacia el noveno-décimo día después de la eclosión.

5.- Se ha estudiado la contribución global del hígado a la actividad reductasa, teniendo en cuenta el aumento en peso de este órgano. Los cambios en la actividad total en el cénit y en el nadir a lo largo de la edad son semejantes a los de la actividad específica, si bien la proporción entre los valores máximos observados a los 14 y 4 días es prácticamente el doble en el caso de las actividades totales frente a las específicas. El mismo fenómeno se ha estudiado en cerebro pese a la ausencia de ritmo en la enzima cerebral, observándose que la contribución de este órgano es constante a lo largo de la edad y marcadamente inferior a la del hígado a partir del día 4.

6.- El cambio de dieta de los animales, adicionándoles colesterol al 5 %, produce un rápido descenso de la actividad reductasa, claramente observable a partir de las 3 h de tratamiento. El ritmo diurno queda afectado, esbozándose tan solo una ligera variación durante el segundo día, si bien la actividad se mantiene siempre por debajo del 20 % de la actividad de los controles. En asa duodenal, el colesterol también disminuye fuertemente la actividad reductasa, hecho que ya es patente a las 3 h de tratamiento. No obstante, parecen persistir pequeñas variaciones rítmicas a lo largo de los dos días de tratamiento, aunque con amplitud muy inferior a la de los animales controles. La actividad reductasa de cerebro no se ve afectada ni en su magnitud ni en sus variaciones por el aporte exógeno de colesterol

La aparición del ritmo durante el desarrollo postnatal y el incremento observado en su amplitud quedan anulados por suplementación de colesterol al 2 % a la dieta desde la eclosión.

7.- En animales sometidos a ayuno, la actividad reductasa hepática desciende ya claramente al cabo de 3h, descenso que se prolonga durante las 48 h de tratamiento, si bien parece insinuarse un ligero ritmo durante el segundo día. La respuesta del asa duodenal frente al ayuno es semejante a la del hígado, aunque el descenso de la actividad es más acentuado durante las primeras horas. La actividad reductasa de cerebro no se ve afectada por el ayuno.

8.- La incorporación de ^{14}C -acetato por cortes de hígado y fragmentos de asa duodenal presenta variaciones rítmicas a lo largo del día cuyo perfil coincide con el de las observadas en la actividad HMG-CoA reductasa. El cambio de dieta, suplementando colesterol al 5 %, disminuye drásticamente la incorporación de acetato por cortes de hígado, así como las variaciones rítmicas de la misma. Un efecto semejante, aunque mucho menos acusado, se observa sobre la incorporación por fragmentos de asa duodenal. El ayuno produce una fuerte y rápida disminución de la velocidad de incorporación de acetato por cortes hepáticos, con supresión total del ritmo. En asa duodenal la disminución es menos acusada, persistiendo variaciones diurnas.

9.- El contenido en colesterol total de los microsomas de hígado no presenta variaciones rítmicas a lo largo de las 48 h de ensayo. Los porcentajes de colesterol libre y esterificado en estos microsomas

16. - El fosforo lipídico de microsomas de cerebro no se modifica sensiblemente durante el día, lo mismo que el porcentaje de cada uno de los fosfolípidos estudiados. La dieta rica en colesterol no cambia los fosfolípidos totales ni el porcentaje de cada uno de ellos. El ayuno parece disminuir rápidamente la cantidad de fosfolípidos totales, correspondiendo este descenso fundamentalmente a la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

17. - La relación molar colesterol/ fósforo lipídico en microsomas de cerebro no cambia ni con la hora del día ni con ninguno de los tratamientos ensayados.

Conclusión final. - De los datos experimentales obtenidos se desprende que el patrón diurno de actividad colesterogénica en el pollo recién nacido está directamente influenciado por la ingesta, aunque la incidencia de los cambios de alimentación investigados es diferente para cada uno de los órganos, atendiendo posiblemente a sus papeles específicos dentro de la interrelación global del metabolismo. El hígado es el órgano más sensible al tipo de ingesta pero no el más rápido en la respuesta. El asa duodenal es, de los órganos estudiados, el primero en acusar las variaciones introducidas en la dieta, aunque en su conjunto se ve menos influenciado por ellas. Finalmente, el cerebro es independiente de estos factores.

Por su celeridad, estas respuestas no parecen deberse a un mecanismo exclusivo de regulación a nivel de síntesis de la HMG-CoA reductasa, preconizado en rata. En el caso de la dieta rica en colesterol, nuestros datos son compatibles con una regulación a corto plazo por alteración de la "fluidez" de la membrana microsomal en que se inserta esta enzima. En el caso del ayuno, este tipo alternativo de regulación, no parece probable.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- CHEVALLIER, F. 1956. L'espace cholesterol du rat. Arch. Sci. Physiol. 10, 249-275.
- 2.- CHEVALLIER, F. 1956. Synthèse du cholesterol chez le rat. Resultats obtenus à l'aide de l'acetate-1-¹⁴C. Arch. Sci. Physiol. 10, 321-336.
- 3.- CHEVALLIER, F. 1967. Dynamics of cholesterol in rats, studied by isotopic equilibrium method. Advances in lipid research, Vol. V edited by R. Paoletti; Academic Press, New York, 209-230.
- 4.- CHEVALLIER, F. 1963. Le méthode d'equilibre isotópique. Ann. Nutr. Aliment. 17, 51-70.
- 5.- EGGEN, D.A. and STRONG, J.P. 1969. Cholesterol metabolism in baboon, rhesus and squirrel monkeys on a atherogenic diet. Circulation 40, 3-7.
- 6.- GRUNDY, S.M. and AHRENS, E.H. 1969. Measurements of cholesterol turnover, synthesis and absorption in man, carried out by isotope kinetic and sterol balance methods. J. Lipid Res. 10, 91-107.
- 7.- MANNING, P.S.; CLARKSON, T.B. and LOFLAND, H.B. 1971. Cholesterol absorption, turnover and excretion rates in hypercholesterolemic rhesus monkeys. Expl. molec. Path. 14, 75-89.
- 8.- KEKKI, M.; MIETTINEN, T.A. and WAHLSTROM, B. 1977. Measurement of cholesterol synthesis in kinetically defined pools using fecal steroid analysis and double labeling technique in man. J. Lipid Res. 18, 99-114.
- 9.- RITTENBERG, D.; SCHOENHEIMER, R. 1937. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XI. Further studies on the biological uptake of deuterium into organic substances, with special reference to fat and cholesterol formation. J. Biol. Chem. 121, 235-253.
- 10.- BLOCH, K. ; BERG, B.N. and RITTENBERG, D. 1943. The biological conversion of cholesterol to cholic acid. J. Biol. Chem. 149, 511-517.
- 11.- CHEVALLIER, F. 1960. Origine des sterols fecaux: II. Determination des quantités de sterols excrétés et secretés et de la fraction du cholesterol des parois digestives renouvelé par transfert. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 42, 633-641.

- 12.- CHEVALLIER, F. 1.953. Le cholesterol: donnés chimiques et apport des méthodes isotopiques dans le connaissance de son metabolisme. Ann. Nutr. Aliment. 7, 305-308.
- 13.- CHEVALLIER, F. et LUTTON, C. 1966. Vitesses des procesus de renouvellement du cholestérol contenu dans son space de transfert chez le rat: I Méthodes et résultats obtenus dans le cas d'un régime semi-synthétique témoin. Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 507-523.
- 14.- BLOCH, K.;BOREK, E. and RITTENBERG, D. 1946. Synthesis of cholesterol in surviving liver. J. Biol. Chem. 162, 441-449.
- 15.- SRERE, P.A.;CHAIKOFF, I.L.;TREITMAN, S.S. et al. 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol.J. Biol. Chem. 182, 629-634.
- 16.- POPJAK, G.;BEECKMANS, M-L. 1950. Extrahepatic lipid synthesis. Biochem. J. 47, 233-238.
- 17.- GOULD, R.G.; COOK, R.P. 1958. The metabolism of cholesterol and other sterols in animals organisms. En "Cholesterol", ed. by Cook, R. P., Academic Press, New York, 237-307.
- 18.- KRITCHEVSKY, D. 1958. Cholesterol, John Wiley Sons, New York.
- 19.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, J.D. 1968. Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relatives rates of synthesis in various tissues and mechanisms of control. J. Clin. Invest. 47, 166-174.
- 20.- DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. 1967. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterols synthesis in seventeen tissues of the rat. J. Lipid Res. 8, 97-104.
- 21.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. 1979. Absolute rates of cholesterol synthesis in extrahepatic tissues measured with ³H-labeled water and ¹⁴C-labeled substrates. J. Lipid Res. 20, 740-752.
- 22.- DIETSCHY, J.M. and Mc GARRY, D. 1974. Limitations of acetate as a substrate for measuring Cholesterol synthesis in liver. J. Biol. Chem. 249, 52-58.
- 23.- GRANDGEORGE, M.; DUPERRAY, B. and PACHECO, H. 1977. Etude de la biosynthèse des acides biliaires par des coupes de foie du rat a

- l'aide de 1-¹⁴C-acetate: Resultats obtenus chez des animaux témoins et des animaux recevant de la cholestyramina. *J. Pharmacol.* 8, 297-314.
- 24.- SIPERSTEIN, M.D. and FAGAN, V.M. 1966. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* 241, 602-609.
- 25.- TOMKINS, G.M. and CHAIKOFF, I.L. 1952. Cholesterol synthesis by liver. I. Influence of fasting and of diet. *J. Biol. Chem.* 196, 569-573.
- 26.- CHEVALLIER, F. 1966. Vitesses de processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert, chez la rat. II. Influence de la concentration du cholestérol alimentaire dans le cas d'un régime semi-synthétique témoin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 715-729.
- 27.- CHEVALLIER, F. et LUTTON, C. 1972. Mouvements des stérols dans le tube digestif d'un rat. Absorption du cholestérol de synthèse. *Biochim. Biophys. Acta* 274, 382-411.
- 28.- CHEVALLIER, F. et LUTTON, C. 1973. The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol.* 242, 61-62.
- 29.- CHEVALLIER, F. and MATHE, D. 1976. Cholesterol Biosynthesis interest of comparing in vivo and in vitro findings. *Path. Biol.* 24, 377-381.
- 30.- LUTTON, C. 1976. The role of the Digestive Tract in Cholesterol metabolism. *Digestion* 14, 342-356.
- 31.- TREADWELL, C.R. and VAHOUNY, G.V. 1968. Cholesterol absorption. *Handbook of physiology*, vol. 3, pp. 1407-1438. (Am. Physiol. Soc., Washington).
- 32.- LUTTON, C. et CHEVALLIER, F. 1972. Analyse des stérols des contenus digestifs et des feces du rat. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 133-145.
- 33.- SKLAN, D.; DAHAN, M.; BUDOWSKI, P. and HURWITZ, S. 1977. Differential absorption of Endogenous and Exogenous Cholesterol in the chick as affected by Dietary Oil level and Phytosterols. *J. Nutr.* 107, 1996-2001.
- 34.- VODOVAR, N.; FLANZY, J. et FRANÇOIS, A.C. 1966. Penetration et acheminement des graisses dans la cellule épithéliale absorbante de l'intestin grêle du porc. *C.r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris* 262, 812-815.

- 35.- HATCH, F.T.; ASO, Y.; HAGOPIAN, L.M. and RUBINSTEIN, J.L. 1966. Biosynthesis of lipoprotein by rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* 241, 1655-1665.
- 36.- VODOVAR, N.; FLANZY, J. et FRANÇOIS, A.C. 1969. The chylomicrons of the intestinal absorptive cell: site of formation, fine structure and function in the mechanism of long chain fatty acid absorption. *Ann. Biol. Animal* 9, 219-232.
- 37.- CHEVALLIER, F. et 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, 253-275.
- 38.- CLEMENT, J. 1961. Les lipides intestinaux et fécaux chez le rat soumis pendant de longues périodes à un régime lipoprive. *Arch. Sci. Physiol.* 15, 345-361.
- 39.- CHEVALLIER, F. et MATHE, D. 1964. Destinée du cholestérol des chylomicrons. III. Mouvements de cholestérol $4-^{14}\text{C}$ entre les chylomicrons et la lymphe ou le serum in vivo. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46, 509-527.
- 40.- CHEVALLIER, F., D'HOLLANDER, F. and VAUGHAN, M. 1971. Plasma cholestérol ester formation in situ and their transfer into the rat tissues in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 248, 524-529.
- 41.- CHEVALIER, F. 1960. Etude des origines des stérols fécaux du rat à l'aide d'indicateurs nucléaires. II. Détermination des quantités de stérols excrétés et de la fraction du cholestérol des parois digestives renouvelé par transfert. *Bull. Soc. Clin. Biol.* 42, 633-641.
- 42.- WINDMUELLER, H. G. and SPAETH, A. E. 1972. Fat transport and lymph and plasma lipoproteins biosynthesis by isolated intestine. *J. Lipid. Res.* 13, 92-105.
- 43.- LUTTON, C. and BROT-LAROCHE, E. 1979. Biliary cholestérol absorption in normal and L-thyroxin-fed rats. *Lipids* 14, 441-446.
- 44.- HURWITZ, S., BAR, A., KATZ, M.; SKLAN, D. and BUDOWSKI, P. 1973. Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *J. Nutr.* 103, 1299-1305



- 45.- SKLAN, D.; BUDOWSKI, P.; ASCARELLI, I. and HURWITZ, S. 1973. Lipid absorption and secretion in the chick; Effect of raw soybean meal . J. Nutr. 103, 1299-1305.
- 46.- LUTTON, C. et CHEVALLIER, F. 1972. Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert, chez la rat. IV. Influence de l'âge, du poids, du sexe, de la gestation et de la lactation. Biochim. Biophys. Acta 280, 116-130.
- 47.- DIETSCHY, S. M. and WILSON, S. D. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. New. Engl. J. Med. 282, 1128 - 1138; 1179-1183; 1241-1249.
- 48.- LUTTON, C. et CHEVALLIER, F. 1972. Vitesses des processus de renouvellement du cholestérol contenu dans son espace de transfert, chez la rat. V. Influence des proportions de glucides, lipides et protéides dans l'alimentation. Biochim. Biophys. Acta. 280, 131-144.
- 49.- MATHE, D. and CHEVALLIER ; F. 1976. Effects of the thyroid state on cholesterol metabolism in the rat. Biochim. Biophys. Acta. 441, 155-164.
- 50.- SIPERSTEIN, M. D. CHAIKOFF, I. L. and REINHARD, W. O. 1952 ¹⁴C-cholesterol. V. Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol. J. Biol. Chem. 198, 111-114.
- 51.- VAN BELLE, H. 1965. Cholesterol, bile acids and atherosclerosis. (North-Holland, Amsterdam).
- 52.- LUTTON, C.; MATHE, D. and CHEVALLIER, F. 1973. Vitesses des processus de chez la rat. VI. Influence de la ligature du cholédoque et de l'ingestion d'acides biliaires on de cholestyramine. Biochim. Biophys. Acta. 306, 483-496.
- 53.- WILSON, J. D. and REINKE, R. T. 1968. Transfer of locally synthesized cholesterol from intestinal wall to intestinal Lymph. J. Lipid. Res. 9, 85-92.
- 54.- SYLVEN, C. and BORGSTROM, B. 1968. Absorption and lymphatic transport of cholesterol in the rat, J. Lipid Res. 9, 596-601
- 55.- SPERRY, W. M. 1927. Lipid excretion. IV. A study of the relationship of the bile to the fecal lipids with special reference to certain problems of sterol metabolism. J. Biol. Chem. 71, 351-378.

- 56.- DANIELSSON, H. 1960. On the origin of the neutral fecal sterols and their relation to cholesterol metabolism in the rat: bile acids and steroids. *Acta Physiol. Scand.* 48, 364-372.
- 57.- CHENG, S. H. and STANLEY, M. M. 1959. Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101, 223-225.
- 58.- SCHOENHEIMER, R. 1931. New contributions in sterol metabolism. *Science.* 74, 579-584.
- 59.- MCINTYRE, N. 1971. Sterol absorption from lumen to liver. *Gut* 12, 411-416.
- 60.- CHEVALLIER, F. and BRANCO, R. J. 1963. Synthèse de cholesterol hépatique à partir d'acetate ¹⁴C chez les rats normaux et porteurs de fistule biliaire. Origine du cholestérol biliaire. *Revue Etud. Clin. Biol.* 8, 903-909.
- 61.- SHI-KAUNG PENG, KANG-SEY HO, and TAYLOR, C. B. 1974. The role of the intestinal mucosa in cholesterol metabolism. Its relation to plasma and luminal cholesterol. *Expl. Molec. Path.* 21, 138-153.
- 62.- CHEVALLIER, F. 1960. Origine des stérols fécaux du rat à l'aide d'indicateurs nucléaires. II. Détermination des quantités de stérols excrétés et secrétés, et de la fraction du cholesterol des parois digestives renouvelé par transfert. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 42, 633-641.
- 63.- LEBLOND, C. P. and STEVENS, C. E. 1948. The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat. Rec.* 100, 357-377.
- 64.- SPRITZ, N.; AHRENS, E. H. and GRUNDY, S. 1965. Sterol balance in man as plasma cholesterol concentration are altered by exchanges of dietary fats. *J. Clin. Invest.* 44, 1482-1493.
- 65.- GRUNDY, S. M. AHRENS, E. H. and MIETTINEN, T. A. 1965. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J. Lipid. Res.* 6, 397-410.
- 66.- MIETTINEN, T. A., AHRENS, E. H. and GRUNDY, S. M. 1965. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J. Lipid. Res.* 6, 411- 424.

- 67.- LUTTON, C. and CHEVALLIER, F. 1976. Coefficient d'absorption du cholesterol alimentaire, parametre fondamental de l'équilibre dynamique du cholesterol chez le rat. *Biomedicine* 24, 205-208
- 68.- SIPERSTEIN, M. F., JAYKO, M. E.; CHAIKOFF, I. L. et al . 1952. Nature of the metabolic products of ¹⁴C-cholesterol excreted in bile and feces *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81, 720-724.
- 69.- BERGSTRON, S. 1952. The formation of bile acids from cholesterol in the rat. *K. Fysiografiska Sällskapetets Föreläsningar (Lund)* 22, 1-15.
- 70.- NORWANN, P. T. and NORUM, K. R. 1976. Newly Synthesized Hepatic cholesterol as precursors for cholesterol and bile acids in rat bile. *Scand. J. Gastroent.* 11. 427-432.
- 71.- DIETSCHY, J.M. 1968. Mechanisms for the intestinal absorption of the bile acids. *J. Lipid. Res.* 9, 297-309
- 72.- LACK, L. and WEINER, I. M. 1961. In vitro absorption of bile salts by Small intestine of rats and guinea pigs. *Amer. J. Physiol.* 200, 313-317.
- 73.- HOLT, P. R. 1964. Intestinal absorption of bile salts in the rat. *Amer. J. Physiol.* 207, 1-7.
- 74.- DIETSCHY, J. M. SALOMON, H. S. and SIPERSTEIN, M. D. 1966. Bile acid metabolism. I. Studies on the mechanisms of intestinal transport. *J. Clin. Invest.* 45, 832-846.
- 75.- SMALL, N. C. and DIETSCHY, J. M. 1968. Characterization of the monomer and micelle components of the passive diffusion process of bile acids across the small intestine of the rat *Gastroenterology.* 54, 12-72
- 76.- SCHIFF, E. R. and DIETSCHY, J. M. 1968. Comparative kinetics of active transport of bile acid analogues. *J. Clin. Invest.* 47, 87.
- 77.- PLAYOUST, M. R., LACK, L. and WEINER, I. M. 1965. Effect of intestinal resection on bile salt absorption in dogs. *Amer. J. Physiol.* 208, 363-369.
- 78.- HARDISON, W. G. M. and ROSENBERG, I. H. 1967. Bile-Salt deficiency in the steatorrhea following resection of the ileum and proximal colon. *New Eng. J. Med.* 277. 337-342.

- 79.- HEATON, K. W., AUSTAD, W. I., LACK, L. et al 1968. Enterohepatic circulation of ¹⁴C-labeled bile salts in disorders of the distal small bowel. *Gastroenterology*. 55, 5-16
- 80.- VAN DEEST, B. W.; FORDTRAN, J. S. MORAWSKI, S. G. et al. 1968. Bile salt and micellar fat concentration in proximal small bowel contents of ileectomy patients. *J. Clin. Invest.* 47, 1314-1324.
- 81.- REINKE, R. T. Jr; and WILSON, J. D. 1967. The mechanism of bile acid absorption into the portal circulation. *Clin. Res.* 15, 242.
- 82.- ERIKSSON, S. 1957. Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rat; bile acids and steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 578-582.
- 83.- KAY, R. E. and ENTENMAN, C. 1961. Stimulation of taurocholic acid synthesis and biliary excretion of lipids. *Amer. J. Physiol.* 200, 855-859
- 84.- BERGSTROM, S. and DANIELSSON, H. 1958. On the regulation of bile acid formation in the rat liver. *Acta Physiol. Scand.* 43, 1-7.
- 85.- TENNENT, D. M., SIEGEL, H., ZANETTI, M. E. et al. 1960. Plasma cholesterol lowering action of bile acid binding polymers in experimental animals. *J. Lipid Res.* 1, 469-473.
- 86.- GRUNDY, S. M., HOFMANN, A. F.; DAVIGNON, J. et al. 1966. Human Cholesterol synthesis is regulated by bile acids. *J. Clin. Invest.* 45, 1018-1019.
- 87.- MAYER, D. 1976. The Circadian Rhythm of Synthesis and Catabolism of Cholesterol. *Arch. Toxicol.* 36, 267-276.
- 88.- ABELL, L. L.; MOSBACH, E. H. and KENDALL, F. E. 1956. Cholesterol metabolism in the dog. *J. Biol. Chem.* 220, 527-536.
- 89.- 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, 409-417
- 90.- WILSON, J. D. 1962. Relation between dietary cholesterol and bile acid excretion in the rat. *Amer. J. Physiol.* 203, 1029-1032.

- 91.- HELLSTROM, K. 1965. On the bile acid and neutral fecal steroid excretion in man and rabbits following cholesterol feeding: bile acids and steroids. *Acta Physiol. Scand.* 63, 21-35.
- 92.- CONNOR, W. E.; WITIAK, D. T., STONE, D. B. and ARMSTRONG, M. L. 1969. Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition *J. Clin. Invest.* 48, 1368-1375
- 93.- GORDON, H.; LEWIS, B.; EALES, L. and BROCK, J. F. 1957. Dietary fat and cholesterol metabolism. Faecal elimination of bile acids and other lipids. *Lancet* 28, 1299-1306.
- 94.- WILSON, J. D. and LINDSEY, C. A. 1965. Studies on the influence of dietary cholesterol on cholesterol metabolism in the isotopic steady state in man. *J. Clin. Invest.* 44, 1805-1814.
- 95.- VLAHCEVIC, Z. R.; GUSTAFSSON, J., SCHWARTZ, C. C., DANIELSSON H.; HALLORAN, G. and SWELL, L. 1980. In vivo studies of cholesterol degradation to bile acids in man. XXIInd International Conference on the Biochemistry of Lipids. May 26-28, Milan.
- 96.- QUINTAO, E; GRUNDY, S. M. and AHRENS, E. H. 1971. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J. Lipid Res.* 12, 233-247.
- 97.- GRUNDY, S. M.; AHRENS, E. H. and DAVIGNON, J. 1969. The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man. *J. Lipid Res.* 10, 304-315.
- 98.- TAYLOR, C. B. and GOULD, R. G. 1950. Effect of dietary cholesterol on rate of cholesterol synthesis in the intact animal measured by means of radioactive carbon. *Circulation* 2, 467-468.
- 99.- GOULD, R. G. 1951. Lipid metabolism and atherosclerosis. *Amer. J. Med.* 11, 209-227.
- 100.- GOULD R. G.; TAYLOR, C. B., HAGERMAN, J. S. et al. 1953. Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro. *J. Biol. Chem.* 201, 519-528.

- 101.- LANGDON, R. G. and BLOCH, K. 1953. The effect of some dietary additions on the synthesis of cholesterol from acetate in vitro. *J. Biol. Chem.* 202, 77-81.
- 102.- FRANTZ, I. D. Jr; SCHNEIDER, H. S. and HINKELMAN, B. T. 1954. Suppression of hepatic cholesterol synthesis in the rat by cholesterol feeding. *J. Biol. Chem.* 206, 465-469.
- 103.- TAYLOR, C. B. and HO, K. J. 1967. Review of human Cholesterol Metabolism. *Arch. Path* 84, 3-14.
- 104.- KAPLAN, J. A.; COX, G. E. and TAYLOR, C. B. 1963. Cholesterol Metabolism in Man. *Arch. Path.* 76, 359-368.
- 105.- BALMER, J. and ZILVERSMIT, D. B. 1974. Effects of dietary roughage on cholesterol absorption, cholesterol turnover and steroid excretion in the rat. *J. Nutr.* 104, 1319-1328.
- 106.- SIPERSTEIN, M. D. and GUEST, M. J. 1960. Studies on the site of the Feedback Control of Cholesterol Synthesis. *J. Clin. Invest.* 39, 642-652.
- 107.- MALINOW, M. R.; PHYLLIS Mc LAUGHLIN, M. D. PAPWORTH, B.A. et al. 1977. Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 2061-2067.
- 108.- MATHE, D.; LUTTON, C. et al. 1977. Effects of dietary Fiber and Salt mixtures on the Cholesterol metabolism of rats. *J. Nutr.* 107, 466-474.
- 109.- RAMACHANDRAN, C. K. and SHAL, S. N. 1976. Descarboxylation of mevalonate pyrophosphate is one rate-limiting step in hepatic cholesterol synthesis in sucking and weaned rats. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 69, 42-47.
- 110.- WISS, O. and WISS, V. 1977. The influence of fasting on the synthesis of cholesterol, squalene, fatty acids and ubiquinones in liver, small intestine and kidney of rats in vivo. *Helvetica Chim. Acta* 60, 2566-2575.
- 111.- RAICHT, R. F.; COHEN, B. I.; SHEFER, S. and MOSBACH, E. H. 1975. Sterol balance studies in the rat effects of dietary cholesterol and β -sitosterol on sterol balance and rate-limiting enzymes of sterol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 388, 374-384.

- 112.- HO, K. J. and TAYLOR, B. 1968. Comparative Studies on tissue Cholesterol. Arch. Path. 86, 585-596.
- 113.- KIM, D. N.; ROGERS, D. H.; LI, J. R. et al. 1976. Effects of cholestiramine on cholesterol Balance Parametres and Hepatic HMG-CoA reductase and Cholesterol 7 α -Hydroxylase Activities in Swine. Expt. Mol. Path. 26, 434-447.
- 114.- MATHE, D. and CHEVALLIER, F. 1977. Effects of long term Feeding of Hydoxycholeic Acid on Cholesterol Metabolism in the rat. Nutr. Rep. Int. 5, 571-576.
- 115.- REYNER, M. O.; MARTEAU, CH.; VIGNE, J. L. et al. 1977. Action of three Bile Acids on hepatic and intestinal cholesterologenesis in the rat. Lipids 12, 254-257.
- 116.- THISTLE, J. L. and SCHOENFIELD, L. J. 1971. Induced alterations in composition of bile of persons having cholelithiasis. Gastroenterology 61, 488-496.
- 117.- THISTLE, J. L. and HOFMANN, A. F. 1973. Efficacy and specificity of chenodeoxycholeic acid therapy for dissolving gallstones. New Engl. J. Med. 289, 655-659.
- 118.- ISER, J. H.; DOWLING, R. H.; MOK, H. Y. I. and BELL, G. D. 1975. Chenodeoxycholeic acid treatment of gallstones: A follow-up report and analysis of factors influencing response to therapy. New Engl. J. Med. 293, 378-383.
- 119.- THISTLE, J. L.; HOFMANN, A. F.; OTT, B. J. and STEPHENS, D. H. 1978. Chenotherapy for gallstone dissolution: I. Efficacy and safety. JAMA 239, 1041-1046.
- 120.- HOFMANN, A. F.; THISTLE, J. L. et al. 1978. Chenotherapy for gallstone dissolution: II. Induced changes in bile composition and gallstone response. JAMA 239, 1138-1144.
- 121.- ADLER, R. D.; BENNION, L. J.; DUANE, W. C. and GRUNDY, S. M. 1975. Effects of low dose chenodeoxycholeic acid feeding on biliary lipids metabolism. Gastroenterology 68, 326-334.
- 122.- LA RUSSO, N. F.; HOFMANN, N. E.; HOFMANN, A. F.; NORTHFIELD,

- T. C. and THISTLE, J. L. 1975. Effects of primary bile acid ingestion on bile acid metabolism and biliary lipid secretion in gallstone patients. *Gastroenterology* 68, 1301-1314.
- 123.- EINARSSON, K. and GRUNDY, S. M. 1980. Effect of feeding cholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol absorption and hepatic secretion of biliary lipids in man. *J. Lipid. Res.* 21, 23-34.
- 124.- SHEFER, J.; HAUSER, S.; LAPAR, V. and MOSBACH, E. H. 1973. Regulatory effects of sterols and bile acids on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme-A reductase and cholesterol-7 α -hydroxylase in the rat. *J. Lipid Res.* 14, 573-580.
- 125.- COOPER, A. P. 1976. The regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A in the perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 57, 1461-1470.
- 126.- NERVI, F. O. and DIETSCHY, J. M. 1978. The mechanisms of and the interrelationship between bile acid and chylomicron-mediated regulation of hepatic cholesterol synthesis in the liver of the rat. *J. Clin. Invest.* 61, 895-909.
- 127.- JUDD, P. A.; KAY, R. M. and TRUSWELL, A. S. 1975. Cholesterol lowering effect of lignin in rats. *Proc. Nutr. Soc.* 35, 73A-74A.
- 128.- KRITCHEVSKY, D; TEPPER, S. A. and STORY, J. A. 1974. Isocaloric, isogravic diets in rats. III. Effect of nonnutritive fiber (alfalfa or cellulose) on cholesterol metabolism. *Nutr. Rept. Int.* 9, 301-308.
- 129.- STORY, J. A.; SHIRLEY, A. T. and KRITCHEVSKY, D. 1977. Influence of dietary alfalfa, bran or cellulose on Cholesterol metabolism in rats. *Artery* 3, 154-163.
- 130.- MUKHERSEE, S. and ALFIN-SLATER, R. B. 1958. The effect of the nature of dietary fat on synthesis of cholesterol from acetate-1-¹⁴C in rat liver slices. *Arch. Biochem Biophys.* 73, 359-365.
- 131.- SERDAREVICH, B and CARROL, K. K. 1972. In vivo incorporation of labeled acetate into liver and serum lipids of rats on different dietary regimens. *Can. J. Biochem.* 50, 557-562.
- 132.- WISS, O. and WISS, V. 1977. On the influence of Cholesterol Feeding and of a Lipogenic Diet on the Cholesterogenesis in Rat liver in vivo. *Helvetica Chim. Acta.* 60, 2686-2694.

- 133.- HARTMANN, G. 1974. Dietary management of hyperlipoproteinemias. En: G. Schettler and A. Weizel (Eds.), *Atherosclerosis III*, New York, N.Y. p. 761.
- 134.- SUNDERAVALLI, O. E.; SHURPALEKAR, K. S. and NARAYANA, R. M. 1973. Inclusion of cellulose in calorie-restricted diets. *J. Amer. Dietet. Ass.* 62, 41.
- 135.- UCHIDA, K. 1975. Effect of Glucose Administration on Cholesterol and bile Acid Metabolism in Rats. *Lipids* 10, 473-477.
- 136.- SUGANO, M.; FUJISAKI, Y. and IDE, T. 1980. Dietary regulation of intestinal 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A in rats. XXIInd International Conference on the Biochemistry of Lipids. May 26-28, Milan.
- 137.- SAUER, F. 1960. Fatty acid, cholesterol and acetoacetate biosynthesis in liver homogenates of normal and starved guinea pigs. *Canad. J. Biochem.* 38, 635-641.
- 138.- JANSEN, G. R.; ZANETTI, M. E. and HUTCHINSON, C. F. 1966. Studies on lipogenesis in vivo: effects of starvation and re-feeding, and studies on cholesterol synthesis. *Biochem. J.* 99, 333-340.
- 139.- BUCHER, N. L. R.; OVERATH, P. and LYNEN, F. 1960. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 491-501.
- 140.- CRAIG, M. C.; DUGAN, R. E.; MUESING, R. A.; SLAKEY, L. L. and PORTER, J. W. 1972. Comparative effects of dietary regimens on the levels of enzymes regulating the synthesis of fatty acids and cholesterol in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 128-136.
- 141.- SLAKEY, L. L.; CRAIG, M. C.; BEYTIA, E. et al. 1972. The effect of fasting, refeeding and time of day on the levels of enzymes effecting the conversion of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A to squalene. *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022.
- 142.- IDE, T.; OKAMATSU, H. and SUGANO, M. 1978. Effects of dietary fats on the activity of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Sterol Synthesis in the liver of Fasted-Refeed Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 24, 535-546.

- 143.- HO, K-J. 1976. Cholesterol contents of various tissues of chickens with exogenous or endogenous hypercholesteremia. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**, 187-191.
- 144.- KATZ, L. N. and PICK, R. 1961. Experimental atherosclerosis as observed in the chicken. *J. Atheroscler. Res.* **1**, 93.
- 145.- SKLAN, D. and BUDOWSKI, P. 1978. Cholesterol metabolism in the liver and intestine of the chick: Effect of Dietary Cholesterol, Taurocholic Acid and Cholestyramine. *Lipids* **4**, 386-390.
- 146.- SKLAN, D.; BUDOWSKI, P, and HURWITZ, S. 1974. Effect of Soy Sterols on intestinal absorption and secretion of cholesterol and bile acids in the chick. *J. Nutr.* **104**, 1086-1090.
- 147.- RAVI SUBBIAH, M. T. and CONNELLY, P. W. 1976. Effect of Dietary restriction on plasma Cholesterol and Cholesterol excretion in the white carneau pigeon. *Atherosclerosis* **24**, 509-513.
- 148.- TOMKINS, G. M. and CHAIKOFF, I. L. 1952. Cholesterol synthesis by liver. I. Influence of fasting and of diet. *J. Biol. Chem.* **196**, 569-573.
- 149.- ECONOMOU, S. G.; TEWS, B. J.; TAYLOR, C. B. et al. 1958. Studies on lipid metabolism in dogs with altered biliary physiology. *Surg. Forum* **8**, 218-221.
- 150.- DIETSCHY, J. M. and SIPERSTEIN, M. D. 1965. Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract: localization and mechanisms of control. *J. Clin. Invest.* **44**, 1311-1327.
- 151.- GOULD, R. G. and POPJAK, G. 1957. Biosynthesis of cholesterol "in vivo" and "in vitro" from DL-3-hydroxy-3-methyl- δ -(2-¹⁴C)-valero-lactone. *Biochem. J.* **66**, 51.
- 152.- BUCHER, N. L. R.; McGARRAHAN, K.; GOULD, E. et al. 1959. Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal, fasting X-irradiated, cholesterol-fed, triton or Δ^4 -cholesten-3-one-treated rats. *J. Biol. Chem.* **234**, 262-267.
- 153.- SUGIYAMA, T.; CLINKENBEARD, K; MOSS, J, and LANE, M. D. 1972. Multiple cytosolic forms of hepatic 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase: Possible regulatory role in cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 255.

- 154.- RODWELL, V. W.; McNAMARA, D. J. and SHAPIRO, D. J. 1973. Regulation of hepatic 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 38, 373.
- 155.- SIPERSTEIN, M. D. 1970. Regulation of cholesterol Biosynthesis in normal and malignant tissues. *En: Current Topics in Cellular Regulation* (B. L. Horecker and E. R. Stadtman, eds.) vol. 2, p. 65-100. Academic Press, New York.
- 156.- DECKER, K. and BARTH, C. 1973. Compartmentation of the early steps of cholesterol biosynthesis in mammalian liver. *Mol. Cell. Biochem.* 2, 179-188.
- 157.- GOULD, R. G. and SWYRYD, E. A. 1966. Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *J. Lipid Res.* 7, 698.
- 158.- JABALQUINTO, A. M. and CARDEMIL, E. 1980. Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis. Role of PP-MVA decarboxylase. *Lipids* 15, 196-199.
- 159.- RODWELL, V. W.; NORDSTROM, J. L. and MITSCHELEN, J. J. 1976. Regulation of HMG-CoA Reductase. *Advances in Lipid Research*, vol. 14, p. 1-74. Ed. by Paoletti and D. Kritchevsky.
- 160.- MITROPOULOS, K. A. 1980. Some dietary factors and the mechanism involved in the regulation of hepatic cholesterol metabolism. XXIInd International Conference on the Biochemistry of lipids. Milan, May 26-28
- 161.- COX, G. E., NELSON, L. G., WOOD, W. B. et al. 1954. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in monkeys' tissue in vitro. *Fed. Proc.* 13, 31.
- 162.- TAKEUCHI, N., IRITANI, N. WELLS, W. W. et al. 1966. Cholesterol biosynthesis in rabbit blood and bone marrow: effect of hematopoietic stimulation and dietary cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 125, 375-388.
- 163.- BAILEY, J. M. 1967. Cellular lipid nutrition and lipid transport. *Wistar. Inst. Sympos. Monogr.* 6, 85-113.
- 164.- STANGE, E. F. SCHNEIDER, A., ALAVI, M. et al. 1980. Inverse relation of cholesterol synthesis and contents in bile acids treated cultured intestine. XXIInd International Conference on the Biochemistry of lipids. Milan May 26-28.

- 165.- WISS, O. 1976. Influence of a lipogenic diet on the cholesterol synthesis in rats in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 68, 350-353.
- 166.- LINDSEY, C. A. Jr.; WILSON, J. D. 1965. Evidence for a contribution by the intestinal wall to the serum cholesterol of the rat. *J. Lipid Res.* 6, 173-181.
- 167.- SHAMA BHAT, C. and RAMASARMA, T. 1979. Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase by phenyl and phenolic compounds. *Biochem. J.* 181, 143-151.
- 168.- BACK P., HAMPRECHT, B. and LYNEN, F. 1969. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of Bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21.
- 169.- DUGAN, R. E.; SLAKEY, L. L., BRIEDIS, A. B. and PORTER, J. W. 1972. Factors Affecting the Diurnal variation in the level of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase and cholesterol-synthesizing activity in Rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 21.
- 170.- SHEFERS, S., HAUSER, S.; LAPAR, V., MOSBACH, E. H. 1972. Diurnal variation of HMG-CoA reductase activity in rat intestine cholestyramine ileum yeyunum crypt cells liver. *J. Lipid. Res.* 13, 571-573
- 171.- SHAMA BHAT, C, SUBBA RAO, G and RAMASARMA, T. 1977. Circadian Rhythm in the utilization of mevalonate for biogenesis of cholesterol. *Indian J. Biochem. Biophys.* 14, 59-64.
- 172.- GOLDFARB, S. and PITOT, H. C. 1971. Improved assay of 3-hydroxi-3-methylglutaril- CoA reductase. *J. Lipid Res.* 12, 512.
- 173.- HULCHER, A. F. H. and OLESON, W. H. 1973. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by measurement of Coenzyme A. *J. Lipid Res.* 14, 625.
- 174.- SHAPIRO, D. J.; NORDSTROM, J. L.; MITCHELSEN, J. J.; RODWEL, V. W. and SHIMKE, R. T. 1974. Microassay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 369.

- 175.- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 176.- CARR, J. J. and DREKKER, I. J. 1962. Laboratory manual of pediatric micro and ultramicro biochemical techniques. O'Brien and Ibloft, F. A. Harper Row Publishers, New York.
- 177.- MARTENSSON, E. H. 1963. Investigation of factors affecting the Liebermann-Buchard cholesterol reaction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 164.
- 178.- SANTIAGO, E.; GANSER, A.; MACARULLA, J. M. and GUERRA, F. 1968. "In vivo" effect of ascorbate on the phospholipid composition of various subcellular fractions. *Rev. Esp. Fisiol.* 24, 37.
- 179.- COROMINAS, A. y PERMANYER, J. J. 1972. Lípidos y lipoproteínas. Vol. 1. Edit, Científico Medica, Barcelona.
- 180.- FISKE, G. H. and SUBBAROW, Y. L. 1925. *J. Biol. Chem.* 65, 375.
- 181.- BARTLETT, G. R. 1959. Phosphorous assay in column chromatography. *Biol. Chem.* 234, 466.
- 182.- VITIELLO, F. and ZANETTA, J. P. 1978. Thin layer chromatography of phospholipids. *J. Chromatogr.* 166, 637.
- 183.- BOVE, S. and HEGARDT, F. 1978. Reversible modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Evidence for an enzyme-catalyzed phosphorylation-dephosphorylation system. *FEBS Lett.* 90, 198.
- 184.- BEG, Z. H.; STONIK, J. A. and BREWER, H. B. 1979. Characterization and regulation of reductase kinase, a protein kinase that modulates the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4375.
- 185.- BEG, Z. H.; STONIK, J. A. and BREWER, H. B. 1977. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from chicken liver. *FEBS Lett.* 80, 123.
- 186.- HASLAM, J. M. and AL MAHDAWIS, S. A. H. 1980. The use of lipid mutants of Saccharomyces cerevisiae to investigate the role of unsaturated fatty acids on sterols in membrane functions. *Biochem. Soc. Transact.* 8, 34.

- 187.- QUINN, P. S.; GOMEZ, R. and MADDEN, T, D. 1980. Modification of membrane lipids of sarcoplasmic reticulum to probe the influence of bilayer fluidity on Ca^{2+} -activated ATPase activity. *Biochem. Soc. Transact.* 8, 38.
- 188.- PHILIPOT, J. R. and WALLACH, D. F. H. 1979. Thermal responsiveness of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and Acetyl-CoA carboxylase in neoplastic Guinea pig lymphocytes (L_2C). *Eur. J. Biochem.* 96, 447.
- 189.- MITROPOULOS, K. A.; BALASUBRAMANIAM, S. et al. 1978. On the mechanism for the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, of cholesterol 7 α -hydroxylase and of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by free cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 99.
- 190.- GREEN, C. 1977. Sterol in cell membranes and model membrane system. En: *Biochemistry of Lipids. II. International Review of Biochemistry*. Vol. 14. Edited by T. W. Goodwin. University Park Press, Baltimore (p. 126).
- 191.- SABINE, J. R. and JAMES, M. J. 1976. The intracellular mechanism responsible for dietary feedback control of cholesterol synthesis. *Life Sci.* 18, 1185.
- 192.- ALEJANDRE; M. J. 1980. Modulación de la actividad HMG-CoA reductasa y de la composición lipídica de los microsomas en función de la edad y de la suplementación oral de colesterol. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Granada.
- 193.- YON, J. 1969. *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*. Hermann Eds., Paris.
- 194.- BERNDT, J. and 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.
- 195.- BEG, Z. H.; ALLMAN, D. W. and GIBSON, D. M. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity with c-AMP and with fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1362.
- 196.- BEG, Z. H.; STONIK, J. A. and BREWER, H. B. 1979. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from avian liver. Catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 83.

- 197.- BEG, Z. H.; STONIK, J. A. and BREWER, H. B. 1978. Solubilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat and chicken liver microsomes. *Anal. Biochem.* 86, 531.
- 198.- KLEINSEK, D. A. and PORTER, J. W. 1979. An alternate method of purification and properties of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 254, 7591.
- 199.- TORMANEN, C. D.; SRIKANTIAH, M. V.; HARDGRAVE, J. E. and SCALLEN, T. J. 1977. Evidence for the presence of a natural inactivating factor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in soluble extracts from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 252, 1561.
- 200.- HELLER, R. A. and GOULD, R. G. 1975. Prevention of cold inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by NADPH. *Biochim. Biophys. Acta* 388, 254.
- 201.- HELLER, R. A. and GOULD, R. G. 1974. Reversible cold inactivation of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 249, 5254.
- 202.- HAMPRECHT, B.; BACK, P. and LYNEM, F. 1969. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11.
- 203.- KANDUTSCH, A. A. and SAUCIER, S. E. 1969. Prevention of cyclic and triton-induced increases and sterol synthesis by puromycin. *J. Biol. Chem.* 244, 2299.
- 204.- GREGORY, K. W.; SMITH, C. Z. and BOOTH, R. 1972. Diurnal variations in rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in relation to feeding. *Biochem. J.* 130, 1163.
- 205.- McNAMARA, D. J.; QUANCKENBUSHI, F. W. and RODWELL, V. W. 1972. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 247, 5805.
- 206.- HICKMAN, P. E.; HORTON, B. J. and SABINE, J. R. 1972. Effect of adrenalectomy on the diurnal variation of hepatic cholesterologenesis in the rat. *J. Lipid Res.* 13, 17.
- 207.- EDWARDS, P. A.; MUROYA, H. and GOULD, R. G. 1972. In vivo demonstration of the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat. *J. Lipids Res.* 13, 396.

- 208.- MERCHANT, J. L. and HELLER, R. A. 1977. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in isolated villous and crypt cells of the rat ileum. J. Lipid Res. 18, 722.
- 209.- SHEFER, S. S.; LAPAR, H. V. and MOSBACH, E. H. 1972. HMG-CoA reductase of intestinal mucosa and liver of the rat. J. Lipids Res. 13, 402.
- 210.- HELLER, R. A. and SHRESBURY, M. A. 1976. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat liver: Its purification, properties and immunological studies. J. Biol. Chem. 251, 3815.
- 211.- RAMASARMA, T. 1972. Control of biogenesis of isoprenoid compounds in animals. In: Current topics in cellular regulation. Vol. 6. Eds. by Horecker, B. L. and Stadtman, E. R. Academic Press, New York.
- 212.- KENTT, C.; SCHIMMEL, S. D. and VAGELOS, P. R. 1974. Lipid composition of plasma membranes from developing chick muscle cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 360, 312.
- 213.- LANG, M. 1976. Dietary cholesterol caused modification in the structure and function of rat hepatic microsomes, studied by fluorescent probes. Biochim. Biophys. Acta 455, 947.
- 214.- KRUSKI, A. W. and NARAYAN, K. A. 1976. Effect of orotic acid and cholesterol on the synthesis and composition of chicken (Gallus domesticus) serum lipoproteins. Int. J. Biochem. 7, 635.
- 215.- NAITO, M. 1978. Effects of cholesterol and cholesterol Esters on cell function. I. Incorporation of free cholesterol and cholesterol oleate into the cell membrane fluidity, membrane fragility and DNA synthesis. Cell. Struct. Funct. 3, 219.
- 216.- 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. Struct. Funct. 3, 227.
- 217.- REDDY, P. V. and SASTRY, P. S. 1978. Effect of undernutrition on the metabolism of phospholipids and gangliosides in developing rat brain. Br. J. Nutr. 40, 403.
- 218.- HIGGINS, M.; KAWACHI, T. and RUDNEY, H. 1971. The mechanism of the diurnal variation of hepatic HMG-CoA reductase activity in the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 138.

- 219.- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. and DIETSCHY, J. M. 1979. active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the liver of the rat. *J. Biol.Chem.* 254, 5144.
- 220.- ERIKSON, S. K.; DAVISON, A. M. and GOULD, G. 1975. Correlation of rat liver chromatin-bound free and esterified cholesterol with the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 409, 59.
- 221.- NEPOKROEFF, C. M.; LAKSHMANAN, M. R. et al. 1974. Regulation of the diurnal rhythm of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by insulin, glucagon, cyclic AMP and hydrocortisone. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 387.
- 222.- BROWN, M. S.; DANA, S. E. and GOLDSTEIN, J. L. 1973. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci, U. S.* 70, 2162.
- 223.- FOGELMAN, A. M.; EDMOND, J; SEAGER, J. and POPJAK, G. 1975. abnormal induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in leukocytes from subjects with heterocygous hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 250, 2045.
- 224.- GOLDFARB; S. 1972. Submicrosomal localization of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *FEBSLett.* 24, 153.
- 225.- MITROPOULOS, K. A.; VENKATESAN, S.; BALASUBRAMANIAM, S. and PETERS, T. J. 1978. The submicrosomal localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, cholesterol 7 -hydroxylase and cholesterol in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 82, 419.
- 226.- LINN, T. C. 1967. The demonstration and solubilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 242, 984.
- 227.- KAWACHI, T and RUDNEY; H. 1970. Solubilization and purification of 3-hydroxy-3-methylglutarylCoA reductase from rat liver. *Biochemistry*, 9, 1700.
- 228.- BROWN, M, S.; DANA, S. E.; DIETSCHY, J. M. and SIPERSTEIN, M. D. 1973. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Solubilization and purification of a cold sensitive microsomal enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 4731.

229. - HELLER, R. A. and GOULD, R. G. 1973. Solubilisation and partial purification of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 859.
230. - ACKERMAN, M. E.; REDD, W. L. and SCALLEN, T. J. 1974. Solubilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from lyophilized rat liver microsomes: lack of evidence for cold lability in this soluble enzyme preparation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 29.
231. - BUNNIG, E. 1973. *The physiological clock* (3rd. ed.) Springer, New York.
232. - RUSAK, B. and ZUCKER, I. 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* Vol. 59. (p. 449).
233. - SUROWIAK, J. F. 1978. Circadian Rhythms. *Med. Biol.* 56, 117.
234. - HALBERG, F. 1969. Chronobiology. *Ann. Rev. Physiol.* 31, 675.
235. - BERNDT, J.; GAUMERT, R. and LOWEL, M. 1972. Effects of puromycin, cycloheximide and actinomycin D on the circadian rhythm of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase in mouse liver. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1454.
236. - EDWARDS, P. A. and GOULD, R. G. 1972. Turnover rate of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase as determined by use of cycloheximide. *J. Biol. Chem.* 247, 1520.
237. - HIGGINS, M. and RUDNEY, H. 1973. Regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity. *Nature New Biol.* 246, 60.
238. - EDWARDS, P. A. and GOULD, R. G. 1974. Dependence of the circadian rhythm of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase on ribonucleic acid synthesis. A possible second site of inhibition by dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* 249, 2891.
239. - FINKEL, R. S. and VOLPE, J. J. 1979. A potential role for phospholipids in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in cultured C-6 glial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 461.
240. - EDWARDS, P. A. 1973. Effect of adrenalectomy and hypophysectomy on the circadian rhythm of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in rat liver. *J. Biol. Chem.* 248, 2912.

- 241.- HUBER, J.; LATZIN, S. and HAMPRECHT, B. 1973. A simple and rapid radiochemical assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1645.
- 242.- LAKSHMANAN, M. R.; NEPOKROEFF, C, M.; NESS, G. C.; DUGAN, R. E. and PORTER, J. W. 1973. Stimulation by insulin of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and cholesterol-synthesising activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 704.
- 243.- HUBER, J.; GUDER, W.; LATZIN, S. and HAMPRECHT, B. 1973. The influence of insulin and glucagon on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in rat liver. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 795.
- 244.- DUGAN, R. E.; NESS, G. C.; LAKSHMANAN, M. R. et al. 1974. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by the interplay of hormones. Arch. Biochem. Biophys. 161, 499.
- 245.- NESS, G. C.; DUGAN, R. E.; et al. 1973. Stimulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in hypophysectomized rats by L-triiodothyronine. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70, 3839.
- 246.- BORTZ, W. M. 1968. Noradrenalin-induced increase in hepatic cholesterol synthesis and its blockade by puromycin. Biochim. Biophys. Acta 152, 619.
- 247.- EDWARDS, P. A. 1975. The influence of catecholamines and cyclic AMP on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity and lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Arch. Biochem. Biophys. 170, 188.
- 248.- BEG, Z. H.; ALLMAN, D. W. and GIBSON, D. M. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity with c-AMP and with protein fractions of rat liver cytosol. Biochem biophys Res. Commun. 54, 1362.
- 249.- RASKIN, P.; McGARRY, J. D, and FOSTER, D. W. 1974. Independence of cholesterol and fatty acid biosynthesis from cyclic adenosine monophosphate concentration in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 249, 6029.
- 250.- KANDUTSCH, A. A. and PAKIE, R. M. 1970. Comparison of the effects of some C₂₇, C₂₁-steroids upon hepatic sterol synthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity. Arch. Biochem. Biophys. 140, 122.
- 251.- KANDUTSCH; A. A. and CHEN, H. W. 1974. Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivative oxygenated in the side chain. J. Biol. Chem. 249, 6057.

- 252.- BROWN, M. S. and GOLSTEIN, J. L. 1974. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 249, 7306.
- 253.- GOLDSTEIN, J. L.; DANA, S. E. and BROWN, M. S. 1974. Sterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 71, 4288.
- 254.- KRZEMIEN, J. R. and HAVEN, G. T. 1974. Demonstration and solubilization of an inhibitor of hepatic cholesterol biosynthesis from rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 369, 70.
- 255.- BROWN, M. S. and GOLDSTEIN, J. L. 1974. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 71, 788.
- 256.- KIRSTEN, E. S. and WATSON, J. A. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in hepatoma tissue culture cells by serum lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 249, 6104.
- 257.- GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. 1973. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 70, 2804
- 258.- GOODWIN, C. D. and MARGOLIS, S. 1973. Specific activation of in vitro cholesterol biosynthesis by preincubation of rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 248, 7610.
- 259.- NORDSTROM, J. L.; RODWELL, V. W. and MITSCHELEN, J. J. 1977. Interconversion of active and inactive forms of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 252, 8924.
- 260.- VICKERS, J. D. and RATHBONE, M. P. 1979. The effect of membrane cholesterol depletion upon erythrocyte membrane-bound enzymes. *Can. J. Biochem.* 57, 1144.
- 261.- CHAPMAN, D. and HOFFMANN, W. 1980. Enzyme function and membrane lipids. *Biochem. Soc. Transact.* 8, 32.

262. - SIPAT, A. B. and SABINE, J. R. 1977. Effect of cholesterol feeding on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and other microsomal enzymes in the rat liver. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* 10, 53.
263. - SUZUKI, H. and URITANI, I. 1977. Effects of bovine serum albumin and phospholipids on activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in sweet potato roots plant. *Plant. Cell. Physiol.* 18, 485.