

12.50.291

T C 56

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

61354699
C15 60940

**EVOLUCION DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN
EMBRION DE POLLO**

CARMEN MARCO DE LA CALLE
Tesis doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1982



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
- GRANADA -	
Sala	B
Fondo	138
Número	224

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIQUICA

1982
1982

EVOLUCION DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN
EMBRION DE POLLO

CARRISER MARCO DE LA GARCIA
Tesis doctoral

... de la Universidad de Granada, en el año 1981, por el profesor Dr. D. Eduardo García Peregrín, catedrático del departamento interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada. Fue leída el día 19 de Diciembre de 1981 ante el tribunal formado por los profesores: Abadía Fenoll; Campos Muñoz; Mataix Verdú; García peregrín; Segovia Parra. Obtuvo la calificación de Sobresaliente "cum laude".

Tesis doctoral dirigida por el profesor Dr. D. Eduardo García Peregrín, catedrático del departamento interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada. Fue leída el día 19 de Diciembre de 1981 ante el tribunal formado por los profesores: Abadía Fenoll; Campos Muñoz; Mataix Verdú; García peregrín; Segovia Parra. Obtuvo la calificación de Sobresaliente "cum laude".

Deseo expresar mi agradecimiento mas profundo al Prof. Dr. D. Eduardo García Peregrín Director del Departamento de Bioquímica, bajo cuya dirección ha sido posible la realización de este trabajo, por la valiosa orientación y dedicación que en todo momento me ha brindado, ayudandome a superar las dificultades encontradas en el desarrollo del tema.

Quiero expresar, asimismo, mi gratitud al Prof. Dr. D. Fermin Sanchez de Medina Contreras puesto que bajo su dirección ingresé en este Departamento al iniciar mi labor de investigación en este campo.

A las Dras. M^a Dolores Suarez y M^a Josefa Segovia mi reconocimiento mas sincero por desinteresado asesoramiento durante la realización de la presente Tesis Doctoral. Deseo agradecer, igualmente, la constante colaboración que en todo momento ha recibido de J. Aguilera, M^a J. Alejandro, A. Linares, D. Gonzalez, H. Ramirez y J. García, que me han hecho comprender el valor del trabajo en equipo.

No quisiera olvidar al resto de los componentes del Departamento por la amistad y ayuda que me han brindado, en especial a M^a Romero y M^a Dolores Franco por su inestimable colaboración.

Al Prof. Dr. D. Cecilio Gonzalez, Jefe de la Sección de Radioquímica de la Facultad de Ciencias y a M^a Angeles Ferro por las medidas de radiactividad.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin 5'-trifosfato
BHB	β -hidroxibutirato
β -ME	β -mercaptotanol
CoA	Coenzima A
d.p.m.	desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diaminotetraacético
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MVA	Acido mevalónico
NADP	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido
-PP	Pirofosfato
POPOP	2,2'-p-toluen bis (1-fenilpicrato)
PBO	2-5-difenilpicrato
PMVA	Acido pirofosfomevalónico
PPMVA	Acido pirofosfomevalónico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

A Antonio y a Jorge

A mis padres

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín 5'-trifosfato
BHB	β -hidroxibutirato
β -ME	β -mercaptoetanol
CoA	Coenzima A
d.p.m.	desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-diaminotetraacético
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MVA	Acido mevalónico
NADP	Fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADPH	Fosfato de niconimadida adenín dinucleótido reducido
-PP	Pirofosfato
POPOP	2,2'-p-fenilen bis-(5-feniloxazol)
PPO	2-5-difeniloxazol
PMVA	Acido fosfomevalónico
PPMVA	Acido pirofosfomevalónico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	<u>Páginas</u>
<u>I.- PARTE TEORICA</u>	26
1. A.- METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	27
1. A.1.- "TURNOVER" DEL COLESTEROL.....	28
1. A. 1. 1. - Particularidades del período em brionario.....	31
1. A. 2.- PAPEL DEL INTESTINO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	33
1. A. 2. 1. - Absorción.....	33
1. A. 2. 2. - Excreción y secreción.....	36
1. A. 2. 3. - Síntesis.....	37
1. A. 2. 4. - Regulación.....	39
1. A. 3. - PAPEL DEL CEREBRO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	41
1. A. 3. 1. - Esteroles en el cerebro en desa- rrollo.....	41
1. A. 3. 2. - Síntesis.....	44
1. A. 3. 3. - Utilización de cuerpos cetónicos.	45
1. A. 3. 4. - Regulación.....	50
1. A. 4. - PAPEL DEL HIGADO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	50
1. A. 4. 1. - Transformación a ácidos biliares.	51
1. A. 4. 2. - Síntesis.....	52
1. A. 4. 3. - Regulación.....	55
1. A. 5. - PAPEL DEL RIÑON EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	60
1. A. 5. 1. - Utilización del ácido mevalónico.	60
1. A. 5. 2. - Regulación.....	65
1. B. - RUTA BIOSINTETICA DEL COLESTEROL.....	68
1. B. 1. - SINTESIS DE HMG-CoA.....	68
1. B. 2. - SINTESIS DE COMPUESTOS ISOPRENOIDES A PARTIR DE HMG-CoA.....	71

1. C. - ENZIMAS IMPLICADAS EN LA SINTESIS, FOSFORILACION Y DESCARBOXILACION DEL ACIDO MEVALONICO.....	74
1. C. 1. - HMG-CoA REDUCTASA.....	74
1. C. 1. 1. - Distribución y localización de la enzima.....	74
1. C. 1. 2. - Cambios en la actividad a lo largo del desarrollo.....	75
1. C. 1. 3. - Regulación de la HMG-CoA reductasa.....	78
1. C. 1. 3. 1. - Modulación covalente.....	78
1. C. 1. 3. 2. - Regulación a nivel de membrana.....	79
1. C. 1. 3. 3. - Modulación por distintos efectores.....	81
1. C. 2. - MEVALONATO CINASA.....	87
1. C. 3. - FOSFOMEVALONATO CINASA.....	89
1. C. 4. - PIROFOSFOMEVALONATO DESCARBOXILASA....	90
<u>II.- PLAN DE TRABAJO</u>	96
<u>III.- PARTE EXPERIMENTAL</u>	100
3. A. - MATERIAL.....	101
3. A. 1. - MATERIAL BIOLÓGICO.....	101
3. A. 2. - CONDICIONES DE INCUBACION.....	101
3. A. 3. - APARATOS.....	101
3. A. 4. - REACTIVOS.....	104
3. B. - METODOS.....	105
3. B. 1. - DETERMINACION DE COLESTEROL.....	105
3. B. 1. 1. - Extracción de lípidos.....	105
3. B. 1. 2. - Determinación de colesterol total	106
3. B. 1. 2. 1. - Técnica.....	106
3. B. 1. 3. - Determinación de colesterol libre y esterificado.....	107

	<u>Páginas</u>
	3. B. 1. 3. 1. - Preparación de las placas 107
	3. B. 1. 3. 2. - Desarrollo y revelado de las placas..... 107
	3. B. 1. 3. 3. - Técnica..... 108
	3. B. 1. 3. 4. - Cálculos..... 109
	3. B. 2. - ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MEVALONATO CI- NASA, FOSFOMEVALONATO CINASA Y PIROFOS FOMEVALONATO DESCARBOXILASA..... 109
	3. B. 2. 1. - Obtención de las preparaciones enzimáticas..... 109
	3. B. 2. 2. - Determinación de las actividades enzimáticas..... 110
	3. B. 2. 2. 1. - Reacciones enzimáticas.... 111
	3. B. 2. 2. 2. - Aislamiento y medida de los productos de reacción..... 112
	3. B. 2. 2. 3. - Cálculos..... 113
	3. B. 3. - INCORPORACION DE MVA POR LA RUTA DE ES TEROLES Y NO ESTEROLES..... 114
	3. B. 3. 1. - Procedimiento de incubación..... 114
	3. B. 3. 2. - Detección de $^{14}\text{CO}_2$ 116
	3. B. 3. 2. 1.- Cálculos..... 116
	3. B. 3. 3. - Lípidos insaponificables..... 117
	3. B. 3. 3. 1. - Extracción..... 117
	3. B. 3. 3. 2. - Medida de los lípidos insa- ponificables totales. Cál- culos..... 118
	3. B. 3. 3. 3. - Separación y medida de los distintos lípidos insaponi- ficables..... 119
	3. B. 4. - ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUC- TASA..... 122
	3. B. 4. 1. - Aislamiento de microsomas..... 122

	<u>Páginas</u>
3. B. 4. 2. - Determinación de la actividad enzimática.....	124
3. B. 4. 2. 1. - Reacción enzimática.....	124
3. B. 4. 2. 2. - Aislamiento y medida del producto de reacción.....	125
3. B. 4. 2. 3. - Cálculos.....	126
3. B. 5. - INCORPORACION DE ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES.....	127
3. B. 5. 1. - Procedimiento de incubación.....	127
3. B. 6. - DETERMINACION DE COLESTEROL Y FOSFORO LIPIDICO EN MEMBRANAS MICROSOMALES.....	128
3. B. 6. 1. - Extracción de lípidos.....	128
3. B. 6. 2. - Determinación de colesterol microsomal.....	129
3. B. 6. 2. 1. - Determinación de colesterol total. Cálculos.....	129
3. B. 6. 2. 2. - Determinación de colesterol libre y esterificado. Cálculos.....	130
3. B. 6. 3. - Determinación de fosfolípidos microsomales. Cálculos.....	131
3. B. 6. 4. - Cálculo de la relación molar colesterol/fosfolípidos.....	133
<u>IV.- RESULTADOS</u>	136
4. A. - EVOLUCION DEL CONTENIDO EN COLESTEROL EN CEREBRO, HIGADO Y RIÑON A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	137
4. A. 1. - VARIACIONES DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN CEREBRO	137
4. A. 2. - VARIACIONES DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN HIGADO.....	142

	<u>Páginas</u>
4. A. 3.- VARIACIONES DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN RIÑON.....	149
4. A. 4. - CAMBIOS EN EL PESO DE CEREBRO, HIGADO Y RIÑON EMBRIONARIO.....	156
4. B. - EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS MEVA- LONATO CINASA; FOSFOMEVALONATO CINASA Y PIROFOS- FOMEVALONATÓ DESCARBOXILASA A LO LARGO DEL DE- SARROLLO EMBRIONARIO.....	161
4. B. 1. - CAMBIOS EN CEREBRO.....	161
4. B. 2. - CAMBIOS EN HIGADO.....	164
4. B. 3. - CAMBIOS EN INTESTINO.....	164
4. B. 4. - CAMBIOS EN RIÑON.....	169
4. C. - INCORPORACION DE 2- ¹⁴ C-MVA A LO LARGO DEL DESA- RROLLO EMBRIONARIO, E INMEDIATO A LA ECLOSION.	172
4. C. 1. - INCORPORACION VIA "SHUNT".....	172
4. C. 2. - INCORPORACION A LIPIDOS INSAPONIFICABLES	172
4. C. 2. 1. - Incorporación en cerebro.....	175
4. C. 2. 2. - Incorporación en hígado.....	181
4. C. 2. 3. - Incorporación en intestino.....	189
4. C. 2. 4. - Incorporación en riñón.....	197
4. D. - EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION.....	205
4. D. 1. - VARIACIONES EN CEREBRO.....	205
4. D. 2. - VARIACIONES EN HIGADO.....	209
4. D. 3. - VARIACIONES EN INTESTINO.....	209
4. D. 4. - VARIACIONES EN RIÑON.....	214
4. E. - VARIACIONES EN LA CANTIDAD DE COLESTEROL Y FOS- FOLIPIDOS EN MICROSOMAS A LO LARGO DEL DESARRO- LLO E INMEDIATO A LA ECLOSION.....	215
4. E. 1. - MICROSOMAS DE CEREBRO.....	215

	<u>Páginas</u>
4. E. 1. 1. - Colesterol y fosfolípidos totales.	215
4. E. 1. 2. - Porcentaje de colesterol libre y esterificado	218
4. E. 1. 3. - Relación molar colesterol / fósforo lipídico.....	218
4.E. 2. - MICROSOMAS DE HIGADO.....	218
4. E. 2.1. - Colesterol y fosfolípidos totales.	221
4. E. 2.2. - Porcentaje de colesterol libre y esterificado.....	221
4. E. 2.3. - Relación molar colesterol/fósforo lipídico.....	221
4. F. - INCORPORACION DE 1- ¹⁴ C ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION.....	226
4. F. 1. - INCORPORACION EN CEREBRO.....	226
4. F. 2. - INCORPORACION EN HIGADO.....	232
<u>V.- DISCUSION.....</u>	243
<u>VI.- CONCLUSIONES.....</u>	279
<u>VII.- BIBLIOGRAFIA.....</u>	287

La importancia del colesterol como componente de las membranas celulares y como regulador de las "fluidos" de estas membranas ha sido universalmente reconocida. Pero es en los comienzos de la vida cuando el colesterol parece desarrollar uno de sus principales papeles con el proceso de mielinización.

Desde que los primeros datos sobre la estructura de la mielina demostraron que está constituida por lípidos y proteínas, son muchos los trabajos llevados a cabo con objeto de conocer sus características histológicas y químicas. Todos ellos coinciden en demostrar que la mielina tiene colesterol, fosfolípidos y galactolípidos en una proporción molar aproximada de 4:3:2, junto con componentes minoritarios como son los llamados "proteolípidos" diversos, etc. El colesterol es el componente lipídico mayoritario de la mielina, habiéndose calculado que, en conjunto, constituye el 25% de los lípidos del cerebro.

Las experiencias animales que han sido realizadas en este aspecto pertenecen al grupo de los ferros y entre ellas, concretamente, la de la importancia relativa del hierro en el desarrollo del sistema nervioso central. **INTRODUCCION**

Se sabe que el hierro es esencial para el desarrollo normal del sistema nervioso central. En el hombre, la deficiencia de hierro durante el embarazo puede dar lugar a un retraso en el desarrollo del sistema nervioso central. En los animales, como el cobaya, se ha observado que la deficiencia de hierro durante el embarazo produce un retraso en el desarrollo del sistema nervioso central.

La importancia del colesterol como constituyente de las membranas celulares y como regulador de la llamada "fluidez" de estas membranas ha sido universalmente reconocida. Pero es en los comienzos de la vida cuando el colesterol parece desarrollar uno de sus principales papeles en relación con el proceso de mielinización.

Desde que los primeros datos sobre la estructura de la mielina demostraron que está constituida por capas de lípidos y proteínas, son muchos los trabajos llevados a cabo con objeto de conocer sus caracteres histoquímicos y bioquímicos. Todos ellos coinciden en demostrar que la mielina contiene colesterol, fosfolípidos y galactolípidos en una relación molar aproximada de 4:3:2 , junto con componentes de naturaleza proteica como son las llamadas "proteínas básicas", diversos proteolípidos , etc. El colesterol es, pues el componente lipídico mayoritario de la mielina, habiéndose considerado que, en conjunto, constituye alrededor de 20% de los lípidos del cerebro.

Las especies animales que han sido estudiadas más intensamente en este aspecto pertenecen al grupo de los mamíferos y entre ellas, concretamente, la rata y el ratón. Los datos relativos al hombre, que lógicamente son de la mayor importancia, son muy escasos.

Se sabe que, en el hombre, la mielinización se inicia hacia los cuatro meses de gestación y no se completa hasta los dos años de vida, mientras que en la rata la mielinización tiene lugar exclusivamente después del nacimiento. Otros animales, como el cobaya, nacen virtualmente mielinizados.



Las particularidades de la mielogénesis humana explican la gran importancia de las lesiones cerebrales que se producen en los primeros meses de vida. En efecto, dado que la vulnerabilidad cerebral decrece a medida que aumenta el grado de mielinización, cualquier lesión que afecte a las células nerviosas cuando aun no están completamente protegidas por la mielina, produce resultados irreversibles, mientras que los mismos factores no afectarían al cerebro humano si se presentaran una vez consolidadas las estructuras que lo integran.

Sin embargo, a pesar de su gran importancia, es relativamente escaso y muy fragmentario lo que hoy se conoce sobre los procesos químicos que caracterizan a una perfecta mielinización. Está ampliamente aceptado que una óptima mielinización depende de la presencia de varias hormonas y de un adecuado estado nutricional durante el desarrollo. En cerebro, se produce un progresivo acúmulo de aquellos lípidos y proteínas que son características de la mielina madura. Según algunos autores la mayoría de los lípidos que son depositados existen como tales o como precursores antes del comienzo de la mielina. No obstante, dado la cantidad de lípidos que se acumulan, es difícil creer que sólo exista una redistribución durante el desarrollo cerebral.

La presente Memoria Doctoral forma parte de una línea de trabajo desarrollada en nuestro Departamento durante los últimos años y orientada al estudio de la biosíntesis del colesterol -como principal constituyente lipídico de la mielina- durante la mielinización del pollo. En este animal, el proceso de mielinización ocurre fundamentalmente durante la fase embrionaria por lo que se puede considerar que en la

eclosión está completamente mielinizado. Por ello, los aspectos químicos del proceso en embrión de pollo pueden aportar luz para la resolución de los problemas que se presentan en otros animales, entre ellos el hombre, en su período perinatal.

Por otra parte, el desarrollo embrionario de las aves reviste unas características especiales que hace de ellas un material excelente para el estudio de los cambios bioquímicos que se presentan en el desarrollo de los animales superiores. Entre ellos hemos de destacar la gran similitud enzimática entre aves y mamíferos, con sólo ligeras variaciones en la regulación hormonal. Asimismo es importante destacar que el desarrollo del embrión de pollo es fácilmente controlable en el laboratorio, con perfecta autonomía e independencia de la madre y de otros factores ambientales, por lo que ha sido considerado en términos fisiológicos como un embarazo estudiado "in vitro".

Los conocimientos que actualmente se tienen sobre la biosíntesis del colesterol en esta etapa son aun muy confusos. Hay algunos trabajos que indican que el colesterol de los mamíferos en gestación es transferido al feto. En aves, parece ser que la mayor parte del colesterol de la yema del huevo procede de la sangre de la gallina ponedora, pero no se sabe con seguridad si el colesterol de los tejidos del embrión y del pollo recién nacido ha sido transferido desde la yema o ha sido sintetizado en los tejidos del polluelo o en las membranas embrionarias.

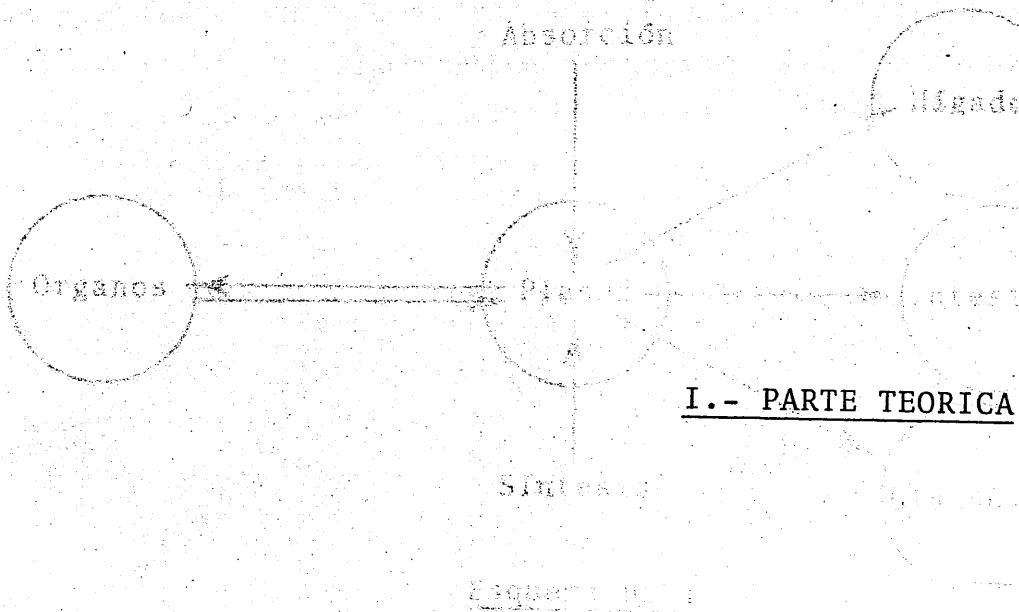
Asimismo, los datos sobre el contenido y evolución de los esteroides totales en embrión son también confusos y hasta contradictorios. Por todo ello se ha creído de interés

estudiar con detalle el contenido en colesterol total, libre y esterificado en distintos órganos del embrión de pollo y sus variaciones a lo largo del desarrollo embrionario, como fase previa a la investigación sobre los niveles de las actividades enzimáticas responsables de la utilización metabólica de los dos principales precursores de la colesterogénesis: ácido mevalónico y acetato.

En efecto, de acuerdo con las dos grandes etapas metabólicas en que se suele considerar dividida la biosíntesis del colesterol, hemos estudiado, por una parte, la evolución de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico, reacciones a las que recientemente se está considerando cruciales en la regulación de la colesterogénesis, y por otra, los cambios en la actividad HMG-CoA reductasa, enzima que ha sido considerada hasta ahora como fundamental en la biosíntesis del colesterol, especialmente en hígado de individuos adultos. Paralelamente a esto, se ha llevado a cabo el estudio de la incorporación de los dos precursores mencionados a los distintos lípidos insaponificables y su evolución a lo largo del desarrollo embrionario. Asimismo, el descubrimiento de que el ácido mevalónico puede ser utilizado para la síntesis de compuestos no esteroídicos por diferentes tejidos de rata recién nacida mediante un proceso conocido ya con el nombre de "shunt del MVA", pone de manifiesto la existencia de una clara interdependencia entre cerebro, hígado, intestino y riñón, órganos en los que hemos estudiado todo el proceso anteriormente mencionado en el intento de contribuir a un mejor conocimiento del papel que tienen en la colesterogénesis y en otras vías metabólicas relacionadas durante la embriogénesis y, en último extremo, a la interpretación de fenómenos que inciden en el recién nacido y que pueden dar lugar a situaciones patológicas no recuperables.

Gran parte de las investigaciones de los años se han enfocado hacia el estudio del metabolismo del colesterol, debido a la gran importancia que este componente tiene en la constitución y mantenimiento de las distintas membranas celulares. Es también precursor de ácidos biliares y hormonas esteroides, habiéndose relacionado, de igual manera, con diversas alteraciones patológicas como la aterosclerosis.

El colesterol en el organismo se encuentra en un equilibrio dinámico, de tal forma que la suma de las velocidades de entrada debe ser igual a la suma de las velocidades de salida para dicho componente. Este equilibrio se podría representar de una forma simplificada, como aparece en el esquema número 1.



... con respecto a la biosíntesis de colesterol...
verificada en distintos órganos del embrión de pollo y sus
ciones a lo largo del desarrollo embrionario, como fase
a a la investigación sobre los niveles de las activida-
enzimáticas responsables de la utilización metabólica de
de principales precursores de la colesterologénesis: ácido
malico + acetato.

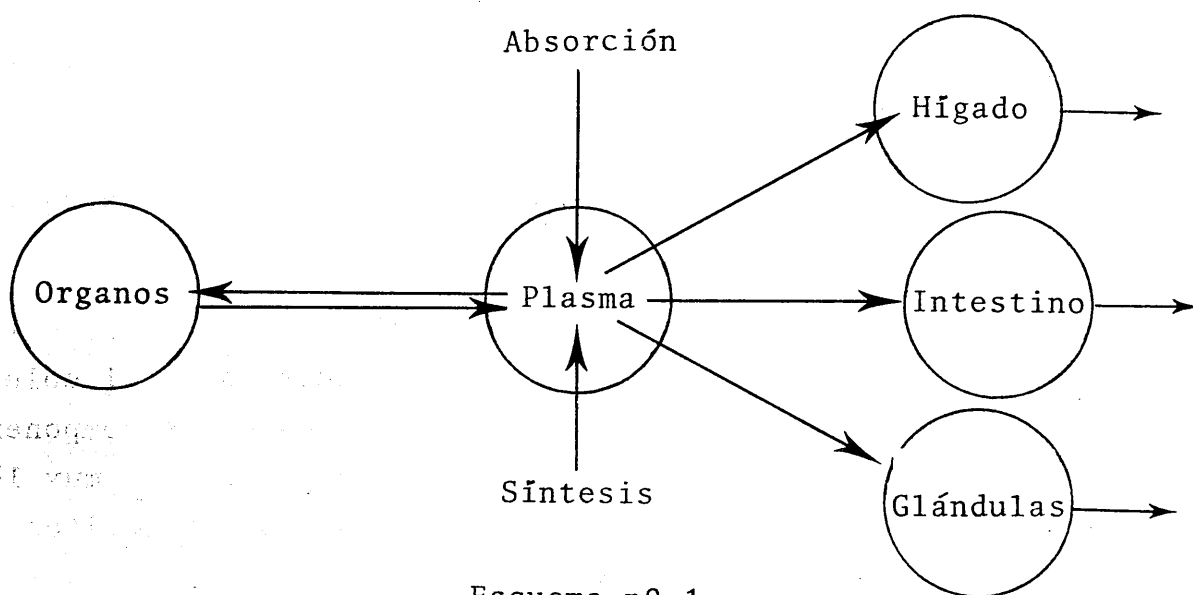
... de acuerdo con las dos grandes etapas
... se puede considerar dividida la biosíntesis
... hemos estudiado, por una parte, la evolución
... implicadas en la fosforilación y descarboxila-
... reacciones a las que recientemente
... cruciales en la regulación de la coles-
... y por otra, los cambios en la actividad HMG-CoA
... enzima que ha sido considerada hasta ahora como
... en la biosíntesis del colesterol, especialmente
... de individuos adultos. Paralelamente a esto, se ha
... el estudio de la incorporación de los dos precur-
... los distintos lípidos insaponificables y su
... a lo largo del desarrollo embrionario. Asimismo, el
... el ácido mevalónico puede ser utilizado
... la síntesis de compuestos no esteroídicos por diferentes
... de rata recién nacida mediante un proceso conocido ya
... nombre de "shunt del MVA", pone de manifiesto la exis-
... interdependencia entre cerebro, hígado, in-
... y riñón, órganos en los que hemos estudiado todo el
... anteriormente mencionado en el intento de contribuir
... mejor conocimiento del papel que tienen en la colesterol-
... y en otras vías metabólicas relacionadas durante la
... y, en último extremo, a la interpretación de fe-
... que inciden en el recién nacido y que pueden dar lugar
... patologías no recuperables.

PARTE TEÓRICA

1. A.- METABOLISMO DEL COLESTEROL

Gran parte de las investigaciones de los últimos años se han enfocado hacia el estudio del metabolismo del colesterol, debido a la gran importancia que este compuesto tiene en la constitución y mantenimiento de las distintas membranas celulares. Es también precursor de ácidos biliares y hormonas esteroídicas, habiendosele relacionado, de igual modo, en los últimos años, con diversas alteraciones patológicas como la aterosclerosis.

El colesterol en el organismo se encuentra en equilibrio dinámico, de tal forma que la suma de las velocidades de entrada debe ser igual a la suma de las velocidades de salida para dicho componente. Este equilibrio se podría representar, de forma simplificada, como aparece en el esquema nº 1.



Esquema nº 1

1. A. 1.- "TURNOVER" DEL COLESTEROL

El plasma constituye el compartimento central de un sistema dinámico que posee exclusivamente dos entradas: la absorción de colesterol procedente de fuentes dietarias y la síntesis endógena de colesterol.

En el compartimento plasmático el colesterol se halla formando parte de las lipoproteínas plasmáticas siendo transportado, de esta forma, tanto en estado libre como esterificado con ácidos grasos.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son responsables principalmente del transporte de colesterol libre (2). Estas lipoproteínas son sintetizadas fundamentalmente en hígado e intestino (3, 4) y proporcionan colesterol esterificado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), por medio de la actuación de la lecitín-colesterol-aciltransferasa (LCAT) que parece actuar fundamentalmente en plasma manteniendo una elevada concentración de colesterol esterificado en éste (5, 6).

El "turnover" de colesterol del plasma es asegurado por dos tipos de procesos:

El primero es el cambio del colesterol libre entre el plasma y todos los órganos. Por este proceso sólo el colesterol libre es intercambiado, permaneciendo los otros componentes de las lipoproteínas en el plasma. Este proceso es muy lento en el hígado y se da fundamentalmente en los eritrocitos (7,8,9).

El segundo proceso corresponde a una desaparición "particulada" de colesterol y en él intervienen todas las clases de lipoproteínas (2, 10, 11). En contraste con el proceso

anterior todos los componentes de las lipoproteínas (colesterol libre y esterificado en particular) son formados simultáneamente por los órganos. Es el único proceso por el que el colesterol esterificado es eliminado del plasma, puesto que en éste no existe colesterol ester hidrolasa. Se da de forma predominante en hígado. Se ha propuesto que las lipoproteínas podrían entrar en las células por un proceso de pinocitosis (3).

En términos de sistema, el colesterol posee tres posibles vías de salida desde el compartimento central:

1.- El colesterol es transferido al hígado en donde se transforma en ácidos biliares.

2.- Una segunda vía de eliminación de colesterol requiere la mediación del tubo digestivo y finaliza en la eliminación fecal de colesterol.

3.- Una tercera ruta corresponde a la transformación hormonal en varias glándulas y la consiguiente eliminación en orina.

A pesar de que la absorción de colesterol exógeno se realiza de forma limitada, la concentración de colesterol en plasma es, entre otros factores, dependiente del tipo de dieta.

Tanto en primates (12) como en pollos (13) se ha determinado un aumento en la concentración plasmática de colesterol como resultado de la administración de una dieta con un elevado contenido en colesterol. Este aumento en la concentración de colesterol en plasma fue acompañado por un aumento en el colesterol total de la aorta debido exclusivamente al incremento de los ésteres de colesterol (13).

En rata, sin embargo, Uchida y col (14) no detectaron cambios en la concentración de lípidos en plasma, aunque sí un aumento en las pre- β -lipoproteínas y una disminución en las

α -lipoproteínas acompañado por un aumento en la secreción biliar y excreción biliar de ácidos biliares totales pero no de colesterol.

En el caso de una dieta rica en fibras (alfalfa por ejemplo) se ha observado una reducción en el nivel de colesterol del suero (15). Se ha postulado (16) que este efecto puede ser debido a la formación de complejos colesterol-saponinas en el tracto intestinal que previenen la absorción de colesterol, tanto exógeno como endógeno.

Gran número de estudios en los últimos años han mostrado una variación del metabolismo del colesterol en relación con la edad. Así, tanto en rata (17, 18) como en hombre (19, 20), se ha demostrado un incremento en la concentración plasmática de colesterol con la edad del animal.

En relación con los cambios en el metabolismo del colesterol en animales con el envejecimiento, se han citado diversos fenómenos tales como una disminución en la síntesis de colesterol (21, 22), disminución en la excreción biliar y fecal de ácidos biliares (18, 23), así como una disminución en la absorción de colesterol (21).

Al aumentar la edad, por lo tanto, los animales son cada vez menos capaces de metabolizar los lípidos; sintetizan menos, pero también degradan y excretan menos. El resultado es la acumulación neta de lípidos en tejidos y sangre (24). Crouse y col (25) han citado un incremento en el contenido en colesterol en distintos tejidos del hombre con la edad, aumentando fundamentalmente a costa del colesterol esterificado. Puesto que el nivel de colesterol esterificado de una célula depende de la hidrólisis previa, se ha propuesto que la actividad colesterol ester hidrolasa disminuye con la edad (26).

1.A.1.1.- Particularidades del período embrionario

Durante el período embrionario el ave se halla localizada dentro de un sistema cerrado y depende de la utilización de las sustancias almacenadas, de origen materno, para su desarrollo. El nivel de colesterol de la yema, aunque bastante constante, es afectado por la edad de la gallina (27), así como por el genotipo de ésta (27, 28) entre otros factores.

La utilización de nutrientes de la yema comienza a partir del segundo día de incubación. La yema es objeto de digestión extracelular ya que el endodermo del saco vitelino segrega enzimas y absorbe los productos de la digestión siendo transportados al embrión vía circulación vitelina (29).

El mecanismo de la absorción de lípidos es muy poco conocido. El nivel de lípidos transportados desde la yema al embrión es bajo en la primera semana de desarrollo (30) pero se acelera enormemente, llegando a alcanzar en la última semana de incubación hasta un gramo por día (31).

Puesto que no existe sistema linfático se podría esperar que la absorción fuese precedida de digestión. Sin embargo monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y lisofosfátidos se hallan en la yema sólo en niveles traza y su concentración no aumenta durante la incubación (32). Esto sugiere que, o los lípidos no son hidrolizados antes de su absorción o que los productos de la hidrólisis son rápida y completamente absorbidos por el endodermo del saco vitelino y usados allí para la síntesis de nuevos lípidos.

La absorción de lípidos se realiza, por lo tanto, con un variable nivel de modificación de las moléculas nativas. El embrión de pollo sintetiza muchos nuevos fosfolípidos posiblemente mediante rotura y resíntesis de los fosfolípidos absorbidos. Por ello, la composición en ácidos grasos de los distintos fosfolípidos del embrión difiere marcadamente de la correspondiente composición en ácidos grasos de los mismos fosfolípidos de la yema.

Mientras la toma de triglicéridos y fosfolípidos se realiza en niveles similares durante la incubación (30), la proporción de colesterol esterificado a libre se incrementa progresivamente en la yema desde el noveno día de incubación (32, 33). Parece probable que esta esterificación tenga lugar en la membrana, puesto que la proporción esterificado/libre es aún mayor en ésta, y que una proporción elevada del colesterol esterificado sea transportado al embrión (34). Aproximadamente todo este colesterol es colesterol oleato y el ácido oleico posiblemente procede de la fosfatidil colina que se halla en una concentración elevada en la yema.

El propósito de la esterificación del colesterol no está totalmente claro, pero la alta proporción de éster de colesterol en los lípidos de quilomicrones y lipoproteínas en el plasma embrionario (35) sugiere que los ésteres de colesterol pueden jugar un importante papel en la formación de algún complejo lipoproteico siendo transportado de esta forma desde la membrana vitelina hasta el embrión.

En la rata y otros mamíferos, durante la etapa embrionaria el colesterol fluye a través de la placenta en dirección de la madre al feto principalmente (36) aunque esta trans-

ferencia parece realizarse en muy baja tasa (37), de tal forma que, en rata, se ha determinado que sólo un 10-15% del colesterol del feto a término procede de la madre (36).

1. A. 2.- PAPEL DEL INTESTINO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol supone la mayor parte (80-85%) de los esteroides presentes en el intestino de rata estando el resto constituido por alguno de sus precursores biosintéticos (38, 39). La mayor parte de este colesterol se halla en forma libre (40). Su concentración parece variar muy poco a lo largo de las distintas porciones del intestino (41, 42), aunque puede ser alterada por distintos tipos de dietas (42). Así la dieta suplementada con colesterol y sebo incrementa los niveles de colesterol intestinal en cabra (41) aunque en pollo (43) no se ha detectado variación por efecto de la alimentación de colesterol, colestiramina o ácido taurocólico. Por otra parte, inhibidores de la síntesis de colesterol, como el 7-cetocolesterol y 25-hidroxicolesterol, reducen la concentración de colesterol en la mucosa intestinal disminuyendo la proporción molar colesterol/fósforo lipídico (40).

1. A. 2. 1.- Absorción

La absorción de colesterol tiene lugar a nivel del intestino y constituye uno de los mecanismos que contribuyen a la tasa de colesterol del organismo.

En el lumen intestinal existe una mezcla de colesterol libre y esterificado de origen tanto exógeno como endógeno, resultado este último fundamentalmente de la secreción biliar y otras secreciones intestinales así como de la descamación de células epiteliales de la mucosa intestinal (44). Sklan y col (45), usando $^{91}\text{YCl}_3$ como sustancia de referencia, no absorbible,

demuestran una diferencia en la tasa de absorción entre el colesterol endógeno y exógeno.

Igualmente se ha demostrado en rata (46) que se absorbe una fracción mayor del colesterol endógeno, quizás debido a una incompleta mezcla en el lumen intestinal del colesterol procedente de ambas fuentes. Puesto que el colesterol endógeno existente en el lumen intestinal procede fundamentalmente de secreción biliar -en donde se halla en estado micelar- es lógico que la absorción del colesterol endógeno sea mayor que la del exógeno ya que éste debería ingresar en las micelas antes de ser absorbido.

La absorción de colesterol se realiza fundamentalmente a nivel del yeyuno y parte del duodeno (47), aunque variaciones en la dieta pueden desplazar la zona de máxima absorción. Así, con una dieta de colesterol al 0.5% la zona de mayor absorción resulta ser la mas distal del yeyuno (48).

La absorción del colesterol exógeno se realiza de forma limitada. Así, aun cuando se incremente mucho la cantidad de colesterol de la dieta, sólo se absorbe parte de éste siendo el resto eliminado (49, 50). Por ello el nivel de colesterol en suero es más estrechamente dependiente de síntesis endógena que de absorción intestinal. De hecho un 75% del colesterol del plasma es de origen endógeno en el hombre (49).

Los mecanismos reguladores de este complejo proceso de absorción no son aún bien conocidos. Numerosos factores han sido citados en los últimos años como elementos moduladores de dicha absorción. Entre estos factores, el tipo de dieta ingerida ha sido objeto de gran atención comprobándose que un aumento en el nivel de colesterol de la dieta disminuye el porcentaje de absorción (50).

Los fitosteroles (esteroles no digeribles) tienen un efecto semejante, disminuyendo la absorción intestinal de colesterol exógeno y no afectando a la del endógeno, siendo ésto probablemente debido a una interferencia en la solubilización micelar del colesterol exógeno. Igualmente diversas sustancias como colestiramina, pectina o celulosa producen una reducción significativa de la absorción linfática de colesterol y triglicéridos en rata (51), probablemente a causa en una interferencia en el proceso de difusión de fase de los lípidos o a mecanismos que implicarían unión a sales biliares intraluminales.

Con un elevado nivel de grasas en la dieta, se incrementa, por el contrario, la absorción intestinal de colesterol (52). Los ácidos biliares, añadidos a la dieta tienen un efecto similar potenciando la absorción de colesterol (53), aunque el mecanismo por el que las distintas sustancias serían capaces de modificar el proceso de absorción resulta complejo, observándose el efecto contrario cuando se incrementa el nivel en la dieta de ácido taurocólico. El ácido quenodeoxicólico, en contraste con el ácido cólico, reduce la saturación de colesterol de la bilis (54) aunque esta disminución en la concentración biliar de colesterol no parece debida a una disminución de su absorción intestinal. También la edad y el sexo se han citado como factores que pueden alterar los niveles de absorción de colesterol (55).

Aunque el proceso de digestión es similar en aves y mamíferos (56) la absorción y el transporte difieren en ambos grupos de animales ya que en pollos los lípidos se absorben a través del sistema porta-sanguíneo como lipoproteínas de muy baja densidad al no presentar las vellosidades intesti-

nales un vaso linfático central como existe en mamíferos. En éstos, sin embargo, los lípidos pasan a la linfa como quilomicrones (57).

1. A. 2. 2.- Excreción y secreción

El mecanismo por el que el colesterol endógeno (excretado y secretado) ingresa al lumen intestinal no está claro. Se ha sugerido que la bilis y las células epiteliales descamadas son las dos únicas fuentes de colesterol intestinal especialmente en el caso del hombre (58).

Sin embargo tras la administración de acetato marcado el colesterol sintetizado aparece muy rápidamente en el lumen (59, 60). Esto difícilmente podría ser explicado por la descamación epitelial; por ello es probable que la secreción y excreción de colesterol por las células de la mucosa intestinal tenga cierta importancia.

Puesto que la mayor parte del colesterol biliar (60-80%) es reabsorbido, es lógico asumir que la bilis no debe suponer más de 1/3 de la excreción fecal de colesterol (46, 61). Esto está apoyado por el hecho de que en ratas alimentadas con colestiramina (2%) o de dieta de colesterol (2%) la excreción fecal de colesterol es tres o cuatro veces mayor que la de controles, pero la excreción de colesterol en bilis sufre sólo un pequeño aumento o bien no cambia (62, 63).

Tras la administración subcutánea o parenteral de colesterol marcado, la radiactividad se localiza rápidamente en el lumen intestinal, aun cuando la bilis es desviada y reemplazada por bilis no marcada de ratas donadoras (64, 65).

Puesto que la proporción colesterol excretado / colesterol secretado en el lumen intestinal es la misma desde el

duodeno al ileon (66) es lógico que no sea sólo una porción del intestino la responsable de excretar o secretar colesterol, aunque no está claro si el intercambio entre las células intestinales y plasma y entre lumen y células intestinales ocurre en todas las células de las vellosidades o bien sólo en la parte responsable de la absorción de colesterol (53).

Realmente el colesterol no es eliminado en heces totalmente como tal sino que parte de éste puede sufrir modificaciones bacterianas en el ciego y colon. Así, una parte del colesterol es convertida en coprosterol por reducción del doble enlace en el carbono 5 (38, 67). En la rata, la excreción fecal de colesterol es relativamente baja comparada con la de ácidos biliares, pero en el hombre la eliminación en forma de esteroides fecales neutros es igual o mayor que la de ácidos biliares (68).

1. A. 2. 3. - Síntesis

Aunque es conocido desde 1950 que el intestino sintetiza colesterol su contribución relativa a la secreción interna es aún cuestionable (68, 69). Usualmente se ha considerado al hígado como responsable de la síntesis de la mayor parte del colesterol del organismo, pero estudios recientes no están de acuerdo con tal punto de vista. Tanto en rata (70) como en mono (71) se ha demostrado que, en condiciones de alimentación con un bajo contenido en colesterol, la mayor tasa de síntesis ocurre en dos órganos: hígado e intestino, aunque en este último en menor tasa.

La actividad de síntesis de esteroides es relativamente baja en yeyuno proximal y permanece constante o disminuye un poco en la porción media del intestino delgado. En el

ileon proximal la actividad sintética aumenta y las tasas de incorporación de acetato a esteroides alcanzan valores máximos en el intestino delgado distal (70, 71). También en pollo, Sklan y Budowski (43) determinan que la capacidad del ileon para la síntesis de colesterol es exclusivamente 1/3 de la del hígado aunque el doble de la del yeyuno.

Dietschy y Siperstein (72) han mostrado que la incorporación de acetato marcado a colesterol en cortes de intestino ocurre predominantemente en las células de las criptas de Lieberkhün, aunque en contraste, Mak y Trier (73) encuentran más incorporación a colesterol marcado desde MVA en el borde de los enterocitos de la parte superior de las vellosidades que en las células de las criptas del saco ileal. Se ha propuesto que este alto nivel de radiactividad podría ser debido al colesterol marcado, sintetizado previamente por las células de las criptas y reabsorbido posteriormente en la zona apical de las vellosidades.

Tanto con las técnicas "in vitro" como "in vivo" es aparente que la contribución relativa de todos los tejidos a la tasa total de colesterol varía apreciablemente dependiendo de la especie estudiada. Taylor y col (74) han hallado, en el caso del hombre, tasas comparables de incorporación de acetato a colesterol en cortes de hígado e intestino. Esto está en contraposición con los resultados de Krumdieck y Ho (75) y Angel y Bray (76) que determinan que, en este origen, es el hígado el órgano preponderante en cuanto a colesterogénesis.

En rata Dietschy y Siperstein (70) concluyen que la tasa de incorporación de acetato a esteroides es mucho mayor en el hígado que en la zona más activa del intestino. Sin embargo estudios más recientes han demostrado que el intestino es el principal órgano implicado en la síntesis de colesterol

(77, 78). Según Chevallier y col el intestino es la fuente del 65% del colesterol sintetizado por día en la rata (77) y el hígado no contribuye a más de un 13% del total (78).

En cerdo , usando acetato como precursor se ha demostrado que hígado e intestino delgado son lugares importantes de síntesis de colesterol (79). En cabra, el tejido adiposo y el intestino son los órganos que exhiben mayor tasa de síntesis de colesterol mientras que el hígado posee una tasa aun menor que cerebro (41, 80).

Los distintos estudios indican en conjunto que existen marcadas variaciones en las tasas relativas de síntesis en las condiciones "in vitro". En todos los animales el hígado y el tracto gastrointestinal tienen las mayores tasas de síntesis por peso de tejido (81). Pero hay limitaciones para extrapolar estos resultados al papel de cada tejido en el balance total de esteroides en el animal intacto.

1. A. 2. 4.- Regulación

En cuanto a los mecanismos de regulación de la colesterogénesis intestinal, no están aún totalmente claros. Dietschy (82), ha postulado que la concentración luminal de ácidos biliares controla la colesterogénesis en intestino delgado de rata, basándose en la observación de que la incorporación "in vitro" de acetato a colesterol en el yeyuno fue aumentada mucho por desvío de bilis o por ligamiento del conducto biliar y fue deprimida por soluciones de bilis o ácidos biliares puros.

En rata no se ha demostrado inhibición "feedback" por colesterol aunque sí en intestino de cobayas (77, 78), aunque es de hacer constar que ésta es la única especie

estudiada que ha demostrado poseer un activo sistema de control "feed-back" en todos los tejidos estudiados.

En pollo, sólo se ha detectado inhibición de la colesterogénesis intestinal por colesterol exógeno mediante técnicas "in vitro" y exclusivamente a nivel del ileon (43). El ácido taurocólico añadido a la dieta mostró "in vivo" capacidad para reducir la colesterogénesis intestinal.

En primates se ha determinado, asimismo, un moderado efecto inhibidor del colesterol en la colesterogénesis intestinal (79). En cabra, la alimentación de colesterol y sebo reduce marcadamente la colesterogénesis en todas las regiones del intestino delgado (41). Bochenek y Rodgers (86) observan en rata inhibición de enzimas implicados en la colesterogénesis y concluyen que el colesterol de la dieta tiene un efecto negativo en la síntesis intestinal de colesterol.

En ratón, aunque no se ha demostrado inhibición de la síntesis de colesterol intestinal por alimentación de colesterol, análogos de éste (7-ceto colesterol y 25 hidroxicolesterol) deprimen su síntesis (40) probablemente debido a la acción de estos inhibidores sobre las células de las criptas intestinales que están expuestas al contenido del lumen.

En rata, Sugano y col (42) observan modulaciones en la distribución de la esteroidogénesis por efecto de distintos tipos de dietas.

Finalmente también se ha observado que el ayuno inhibe la síntesis de colesterol en rata (87) y cobaya (83) aunque la colestiramina ha demostrado ser inefectiva en este último caso.

1. A. 3.- PAPEL DEL CEREBRO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

De los esteroides presentes en el sistema nervioso de un animal adulto, el colesterol es el más importante cuantitativamente alcanzando concentraciones excepcionalmente altas pudiendo llegar a constituir hasta un 10% de su peso seco en contraste con otros órganos donde representa menos del 1% (88). La acumulación de colesterol en cerebro está asociada con la formación de las vainas de mielina en las que se encuentra en concentración particularmente alta, representando 2/5 de los lípidos totales existentes en la mielina (89).

En el cerebro maduro, al contrario del cerebro en desarrollo se ha indicado un bajo índice de recambio para el colesterol (88), pero estudios recientes (90) han demostrado, mediante tratamiento a ratas jóvenes y adultas con un inhibidor de la biosíntesis de colesterol, que, en ambos casos, parte de él puede ser sustituido en la mielina por otros esteroides, entre ellos el 7-dehidrocolesterol, indicando la existencia de un constante intercambio del colesterol de la mielina con el existente en otros compartimentos del sistema nervioso central.

1. A. 3. 1. - Esteroides en el cerebro en desarrollo

En contraposición con el cerebro en desarrollo, el cerebro del animal adulto posee una baja tasa de síntesis (70, 71). Durante el desarrollo, el tejido cerebral sintetiza activamente colesterol para atender a las necesidades que de este componente precisa la constitución y mantenimiento de las vainas de mielina (91). Esta activa síntesis "de novo" se refleja en un aumento en los niveles de colesterol como el detectado por Mandel y Bieth (92) en cerebro de rata desde el recién nacido al adulto.

Es por tanto lógico que se detecten precursores del colesterol en mayores niveles en el tejido cerebral inmaduro que en el cerebro de animales adultos. Así durante el desarrollo del cerebro de embrión de pollo (93), rata (94, 95) y hombre (95) este tejido contiene desmosterol (un precursor del colesterol) en niveles considerables.

La proporción desmosterol / colesterol disminuye regularmente en correlación con la maduración cerebral, particularmente con la deposición de mielina, como se ha demostrado en distintas especies animales (96), siendo el desmosterol prácticamente indetectable en el cerebro del animal adulto. El descenso en la concentración de desmosterol está relacionado con el aumento en la actividad desmosterol reductasa detectado al comienzo de la mielinización (97), aunque la razón de la acumulación de desmosterol en tejidos inmaduros es aún incierta.

Un número considerable de esteroides se ha detectado, asimismo, tanto en cerebro adulto como en el tejido cerebral de animales en desarrollo, aunque en éstos los niveles son siempre mayores (98).

El colesterol está presente en el cerebro maduro casi exclusivamente en forma libre (99, 100), sin embargo en el cerebro del animal en desarrollo se halla una pequeña proporción de éste en forma esterificada. Se ha detectado ésteres de colesterol en médula espinal de embrión de pollo y en cerebro de feto humano (101), así como en cerebro de niños recién nacidos (102) y en ratas durante el periodo de mielinización (103).

Estos hechos junto con la demostración histoquímica de la presencia de ésteres de colesterol en la mielina durante el desarrollo del cerebro (99, 101) dan pie a la idea

de que el colesterol esterificado es precursor del libre en la mielina. No se sabe exactamente la función de este aumento en la concentración de colesterol esterificado antes de la mielinización y Ramsey (104) ha apuntado la idea de que constituirían un almacenamiento de ácidos grasos para otros procesos biosintéticos.

El hecho de que la concentración de colesterol esterificado sea bastante pequeña mientras que grandes niveles de colesterol son incluidos en la vaina de mielina (105) sólo sería compatible con un papel importante para los ésteres de colesterol como precursores, si estos ésteres se renovasen con una tasa muy rápida. En efecto, se ha podido demostrar por diversos autores (106, 107, 108) la existencia en cerebro de rata de una enzima con actividad esterificante y que sufre variaciones en su actividad a lo largo del desarrollo (106). Asimismo, se ha detectado en cerebro de rata actividad hidrolítica sobre los ésteres de colesterol (106, 107, 109). Esta actividad sufre un brusco aumento entre la primera y cuarta semana de edad en la rata, periodo que coincide con la etapa de mielinización activa en cerebro de rata (109).

Todos estos hechos tienden a confirmar la idea apuntada por Volpe y col (110) de que el desmosterol y el colesterol esterificado juegan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de colesterol durante el desarrollo, diferenciación y mielinización en el sistema nervioso. Ambos esteroides se hallan también presentes en tumores cerebrales en niveles apreciables (111) probablemente debido a la existencia de una importante síntesis de esteroides en tejidos tumorales como lo sugiere la activa incorporación de precursores marcados a colesterol en tumores cerebrales (112).

1. A. 3. 2.- Síntesis

Mediante experiencias tanto "in vivo" como "in vitro" se ha demostrado que son las células gliales las responsables de la síntesis de esteroides en cerebro (113), siendo, al igual que en otros tejidos, en la fracción microsomal y la soluble donde se realiza esta síntesis (103). La fracción microsomal es la responsable primariamente de la conversión de escualeno a colesterol (114).

Existen evidencias de un metabolismo diferencial del colesterol en cerebro y otros tejidos en relación con la edad. Waelsch y col (115, 116) inyectando agua pesada a ratas adultas detectaron sólo trazas de deuterio en los lípidos insaponificables de cerebro mientras cantidades apreciables del isótopo se incorporaron a la fracción no saponificable de hígado e intestino. Cuando el agua pesada se administraba a ratas recién nacidas se observó una rápida incorporación a lípidos insaponificables en una medida inversamente relacionada con la edad. A pesar de la dificultad de detectar biosíntesis en el cerebro adulto se sabe que éste contiene el complemento enzimático necesario para la síntesis de ésteroides y es semejante al del hígado (114).

Usando ^{14}C -acetato como precursor, Hellstrom (117) no pudo detectar incorporación a colesterol en cortes de cerebro de rata adulta. En neonatos sin embargo la incorporación desde este sustrato a esteroides excede incluso a los valores encontrados para el hígado (69). Estos datos están de acuerdo con los resultados de Kandutsch y Saucier (118) que detectan gran incorporación desde acetato y MVA marcados radiactivamente a esteroides en ratas recién nacidas. La tasa de incorporación aumentó desde el nacimiento hasta los 11 días de edad para de-

clinar posteriormente hasta alcanzar el nivel adulto. En pollo recién nacido, sin embargo no se detectó incorporación importante de 2-¹⁴C-MVA a esteroides (100) aunque se ha de hacer constar que el pollo nace virtualmente mielinizado y su cerebro presenta, por lo tanto, las características de un estado adulto en este aspecto.

La velocidad de incorporación "in vivo" de distintos precursores depende de numerosos factores, entre ellos de su ruta de administración. Así Ramsey y col (103) concluyen, comparando distintos métodos de administración que sólo la administración del precursor mediante inyección intracerebral puede indicar la verdadera capacidad del cerebro para sintetizar colesterol ya que de esta forma aumenta el nivel de precursor disponible para biosíntesis en cerebro y se elimina la dificultad de éste para atravesar la barrera hematoencefálica.

1. A. 3. 3. - Utilización de cuerpos cetónicos

Edmond (119), comparando la actuación de β -hidroxibutirato (BHB), acetoacetato, acetato y MVA, marcados radiactivamente, como precursores de lípidos en el sistema nervioso central, mostró la utilización preferencial de los cuerpos cetónicos sobre los otros sustratos para la síntesis de lípidos en etapas iniciales del desarrollo de rata.

Asimismo mediante estudios "in vivo" (120, 121, 122) se ha demostrado el empleo preferente en el cerebro (sobre el hígado o riñón) de cuerpos cetónicos y glucosa para la síntesis de ácidos grasos y esteroides en rata, siendo su incorporación en aquel órgano mucho mayor desde cuerpos cetónicos que desde glucosa y aún más desde β -hidroxibutirato que desde acetoacetato.

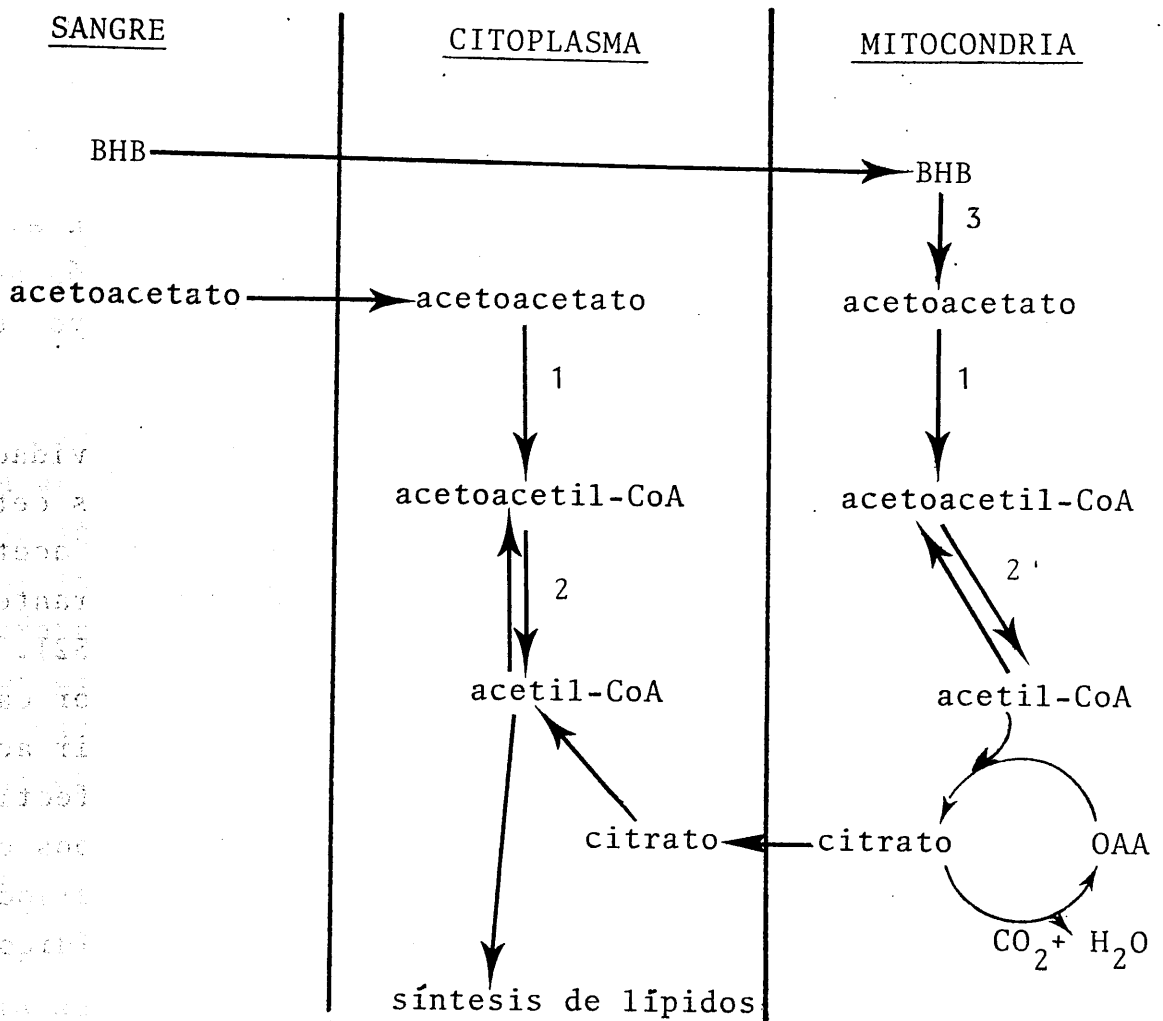
Mediante estudios "in vitro" con cortes (123) y homogenados (124) de cerebro de rata se ha demostrado, igualmente, que los cuerpos cetónicos son mejores precursores que la glucosa para la síntesis de lípidos, incrementándose la tasa de síntesis a partir de cuerpos cetónicos durante la primera semana de vida postnatal y disminuyendo posteriormente. Esta elevada tasa de síntesis fue acompañada por un aumento en las actividades de las enzimas implicadas en la utilización de cuerpos cetónicos en cerebro (124).

También mediante experiencias "in vivo" se ha mostrado un patrón de utilización de cuerpos cetónicos que varía con la edad. Así, se ha observado a lo largo del desarrollo un incremento en el marcado de los esteroides cerebrales en rata, incremento que fue máximo entre los 6 y 18 días posteriores al nacimiento para descender después hasta alcanzar los niveles adultos (122, 125).

Se ha demostrado que las enzimas necesarias para la utilización de acetoacetato son activas en cerebro neonatal de ratas. Buckley y Williamson (126) detectaron la existencia de una acetoacetil-CoA sintetasa en cerebro de ratas jóvenes y adultas, siendo la actividad tres o cuatro veces mayor al nacimiento que en etapas posteriores. Esta actividad disminuye lentamente durante el periodo de desarrollo hasta el nivel adulto. También se ha demostrado en cultivo de oligodendrocitos (127) y en homogenados de cerebro de rata (124) importantes actividades acetoacetil CoA sintetasa y acetoacetil coenzima A tiolasa.

Tradicionalmente se ha supuesto que la mayor ruta de utilización de cuerpos cetónicos está localizada en la mitocondria y sirve principalmente para abastecer los requerimientos de energía por parte de cerebro cuando el nivel de glucosa es bajo.

Recientemente se ha postulado la existencia de una ruta extramitocondrial por diversos autores (127, 128). Esta ruta implicaría la actuación de la acetoacetyl CoA tiolasa y acetoacetyl CoA sintetasa. Ambas rutas aparecen indicadas en el esquema nº 2 (128).



- 1.- Acetoacetyl-CoA sintetasa
- 2.- Acetoacetyl-CoA tiolasa
- 3.- BHB deshidrogenasa

Esquema nº 2

Existe evidencia de que esta ruta es operativa en citoplasma de cerebro de ratas lactantes, ya que el (-)-hidroxicitrato (inhibidor de la ATPcitrato liasa) o inhibidores de transporte mitocondrial de citrato disminuyen la incorporación a lípidos desde ^{14}C -glucosa o BHB pero no de acetato o acetoacetato (129).

También Webber y Edmond (125) han postulado una ruta citoplasmática alternativa que supondría la incorporación directa de acetoacetyl CoA a HMG-CoA mediante la HMG-CoA sintasa citoplasmática que sería usada para la síntesis de esteroides sin conversión previa a acetyl-CoA. La HMG-CoA sintasa existe en citoplasma y mitocondria y se ha observado un patrón de desarrollo, siendo la actividad citoplasmática mucho mayor en la lactancia que tras el destete (130).

Algunos autores han indicado que las actividades de las enzimas implicadas en la utilización de cuerpos cetónicos -BHB deshidrogenasa, acetoacetyl-CoA sintetasa y acetoacetyl-CoA tiolasa- son mayores en el cerebro de rata durante el periodo de lactancia que en el cerebro adulto (131, 132). Lógicamente estas altas actividades deben indicar una mayor capacidad para la utilización de cuerpos cetónicos y deben ir acompañadas de un aumento en el nivel de éstos en sangre. Efectivamente la concentración de ácidos grasos libres y de cuerpos cetónicos en sangre de rata permanece alta a través del periodo de lactancia (132) como resultado del alto contenido lipídico de la leche materna.

Otro factor que favorece la idea de que los cuerpos cetónicos son sustrato importante durante el desarrollo del cerebro es el hecho de que las actividades de las enzimas implicadas en la utilización de cuerpos cetónicos muestran un patrón de actuación diferente en cerebro a los de riñón y cora-

zón (132). Estos dos tejidos, que tienen las mayores actividades enzimáticas por peso en el adulto, presentan sin embargo actividades muy bajas en el nacimiento, actividades que aumentan a través del periodo de lactancia hasta alcanzar valores máximos tras el destete. Como el cerebro representa una mayor proporción del peso del cuerpo en el periodo de lactancia que el riñón o corazón, el resultado neto de las diferencias en los patrones de actividad en los tres órganos es que el cerebro es el principal tejido en la utilización de cuerpos cetónicos durante el periodo de lactancia, siendo usados no sólo como fuente de energía sino también de carbono para la síntesis de lípidos (123, 124).

En pollo, la predominancia del metabolismo lipídico durante la última semana de incubación está bien establecida (133). El pollo tras la eclosión se halla nutricionalmente en un periodo de ayuno con una alta oxidación de ácidos grasos que inducen una excesiva toma de acetyl-CoA por el hígado y, por lo tanto, un aumento en plasma de cuerpos cetónicos. Este metabolismo lipídico cambia a un metabolismo glucídico durante los cinco días siguientes a la eclosión. Esto induce en sangre un nivel de BHB cinco veces mayor en pollos de un día que en pollos de cuatro o treinta días (134).

Mediante experimentos "in vivo" e "in vitro", Nehlig y col (134) han comprobado que la toma de BHB por el cerebro de pollo es tres o cuatro veces mayor en pollos de un día que en los de cuatro o treinta días. Estos hechos indican que los cuerpos cetónicos juegan, como en rata, un papel importante en el desarrollo del cerebro de pollo.

1. A. 3. 4. - Regulación

Poco es conocido sobre el mecanismo de control que afecta a la secuencia desde acetato a escualeno en la biosíntesis de colesterol. Kandutsch y col (118) han indicado que posiblemente existe una inhibición "feed-back" en cerebro a nivel de la HMG-CoA reductasa, enzima que regula la síntesis de colesterol en ratones a partir de 11 días tras el nacimiento, pero no antes. Alternativamente, se ha sugerido para explicar la baja síntesis de colesterol en cerebro adulto, que en este órgano puede existir una carencia en cofactores o en proteínas transportadoras de esteroides (104).

La síntesis de colesterol en cerebro ha mostrado ser sensitiva al ayuno y a la malnutrición, particularmente durante el periodo de desarrollo. La tasa de deposición de colesterol en cerebro de ratas lactantes es reducida significativamente por la malnutrición (135). Cortos periodos de ayuno afectan a la incorporación de precursores marcados a colesterol (136).

1. A. 4. - PAPEL DEL HIGADO EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

El hígado es uno de los órganos en los que el metabolismo del colesterol ha sido objeto de un mayor número de estudios.

En el animal adulto el colesterol se halla fundamentalmente en forma libre (137, 138) aunque los ésteres de colesterol constituyen una parte importante del "pool" de esteroides.

Los niveles de colesterol hepático han mostrado ser enormemente variables en distinto tipo de situaciones. Así, se ven afectados por stress (139), hepatectomía parcial (140),

deficiencia de cobre en ratas (141), entre otros factores. También el tipo de dieta es un factor que afecta en gran medida al nivel de colesterol del hígado. Así, una dieta rica en colesterol induce un aumento en los niveles hepáticos de éste en distintas especies animales: cobaya (83), rata (142), pollo (138) y cabra (41).

El uso de cóleréticos (143) y colestiramina (144) en rata, produce un aumento en la concentración de colesterol hepático, aunque Turley y Dietschy (145) sólo han encontrado variación en los niveles de colesterol hepático por alimentación con colesterol y ácidos biliares así como por infusión de quilomicrones y no por colestiramina o ayuno. En cobaya, igualmente, no se ha encontrado variación en la concentración de colesterol ni por alimentación con colestiramina, ni por ayuno (83).

Los niveles de colesterol no parecen ser afectados en rata por la edad, siendo el efecto de la dieta idéntico en animales jóvenes que en adultos (22). En pollos recién nacidos se ha observado sin embargo un marcado descenso en los niveles de colesterol hepático desde el nacimiento hasta los 6-7 días de edad a partir de donde la disminución es más lenta (100). Esta variación fue debida fundamentalmente al descenso en los niveles de colesterol esterificado.

1. A. 4. 1. - Transformación a ácidos biliares

La transformación de colesterol a ácidos biliares es un proceso importante del recambio de colesterol en el cuerpo. Se ha establecido que el papel de los ácidos biliares consiste en promover el movimiento de colesterol desde el lumen a la linfa intestinal (146) . Son necesarios para la emulsión

y digestión de los ésteres de colesterol dietario, así como para el movimiento de colesterol a través de las capas de agua del intestino y movimiento de quilomicrones a la linfa intestinal (147, 148). Por ello bajo circunstancias donde el nivel de colesterol del lumen es constante, el nivel absorbido depende críticamente del tamaño del "pool" funcional de ácidos biliares.

La tasa de síntesis de ácidos biliares está estrechamente relacionada con la toma de colesterol (1) y el control de la transformación es dependiente del transporte particulado de lipoproteínas del plasma al hígado, o sea, que desde el punto de vista fisiológico el proceso que gobierna la toma de colesterol desde el plasma al hígado es la etapa limitante en la transformación de colesterol a ácidos biliares. El punto de control de la biosíntesis de ácidos biliares está ejercido a nivel de la hidroxilación de colesterol por la 7- α -hidroxilasa (149).

El colesterol ingerido en la dieta estimula la formación de ácidos biliares en distintas especies (14, 43) aunque en hombre no se ve muy afectada por grandes cantidades de colesterol dietario.

En rata, Turley y Dietschy (145) concluyen que la tasa de síntesis hepática de colesterol, el nivel de ésteres de colesterol en hígado y el nivel de colesterol absorbido en la dieta no determinan la tasa de síntesis biliar.

1. A. 4. 2. - Síntesis

El hígado ocupa una posición central en el metabolismo del colesterol puesto que es uno de los órganos más activos en su síntesis y también en su eliminación por conversión a ácidos biliares. La importancia de la colesterogé-

nesis hepática en la determinación de los niveles de colesterol en suero está resaltada por el hecho de que el colesterol sérico está en rápido equilibrio con el "pool" de colesterol hepático (151).

Usualmente la determinación de la tasa de colesterogénesis ha implicado la medida de la incorporación del sustrato marcado, por ejemplo acetato, o el ensayo de la HMG CoA reductasa. Actualmente se tiende a pensar que el uso de acetato es de dudosa relevancia fisiológica ya que el tamaño del "pool" de acetato depende del estado nutricional y hormonal. Consiguientemente los datos obtenidos de la medida de la incorporación de sustratos "in vitro" a los obtenidos de la medida de la actividad HMG CoA reductasa pueden ser contradictorios (151).

Los ensayos "in vitro" han ofrecido información sobre los aspectos cuantitativos y cualitativos de la síntesis de colesterol en los principales órganos del cuerpo. En especies tales como rata, mono y hombre, las mayores tasas de incorporación de acetato marcado radiactivamente a esteroides precipitables con digitonina se han hallado en hígado (50), aunque también el ileon exhibe elevadas tasas de síntesis de esteroides mientras el resto de los tejidos del cuerpo incorporan acetato a esteroides en menor proporción (70, 71) calculándose que el hígado más el intestino recogen un 90-97% del acetato, incorporado a esteroides precipitables con digitonina, que es detectado en todos los tejidos del cuerpo bajo las condiciones "in vitro".

Mediante estudios "in vivo" se ha concluido que el hígado supone un 54% de la síntesis de colesterol total en el cuerpo aunque, en condiciones de ayuno o alimentación con colesterol donde la síntesis de colesterol está inhibida en el hígado, los tejidos extrahepáticos pueden llegar a suponer de un 70-

90% de la síntesis total de colesterol en el cuerpo (152).

En pollo, mediante estudios "in vivo" e "in vitro" se ha concluido que el hígado es el lugar más importante de síntesis de lípidos (153). Se han encontrado variaciones en la incorporación de MVA y acetato en cortes de hígado de pollo en los primeros días de vida (100, 154). Así la incorporación aumenta desde la eclosión hasta los 11-15 días momento a partir del cual se mantiene. Los niveles mínimos detectados tras la eclosión se han explicado en base al posible efecto inhibitor del colesterol de la yema sobre la colesterogénesis hepática, de tal forma que cuando el animal pasa a una dieta con un bajo contenido lipídico se eliminaría el efecto inhibitor del colesterol aumentando por lo tanto los niveles de síntesis.

También en rata, Shah (155) ha demostrado un cambio en la conversión de MVA a esteroides y fracción no saponificable tras el destete. Se sugiere que la síntesis de colesterol en hígado de ratas lactantes es inhibida por el colesterol de la leche materna y que el rápido aumento en la síntesis tras el destete es debido en parte al cambio dietario que acompaña a éste y en parte a una mayor necesidad de colesterol para el hígado en desarrollo. Estos hechos están de acuerdo con los resultados de Johnson y Shah (156) que observan igualmente menor incorporación de MVA y escualeno a esteroides precipitables con digitonina en ratas lactantes que destetadas, aunque este aumento es prevenido por alimentación de colesterol tras el destete y concluyen que el colesterol de la dieta previene el incremento observado en la síntesis de colesterol en el hígado en desarrollo por supresión de las actividades de una o más enzimas que actúan entre MVA y escualeno y entre éste y colesterol.

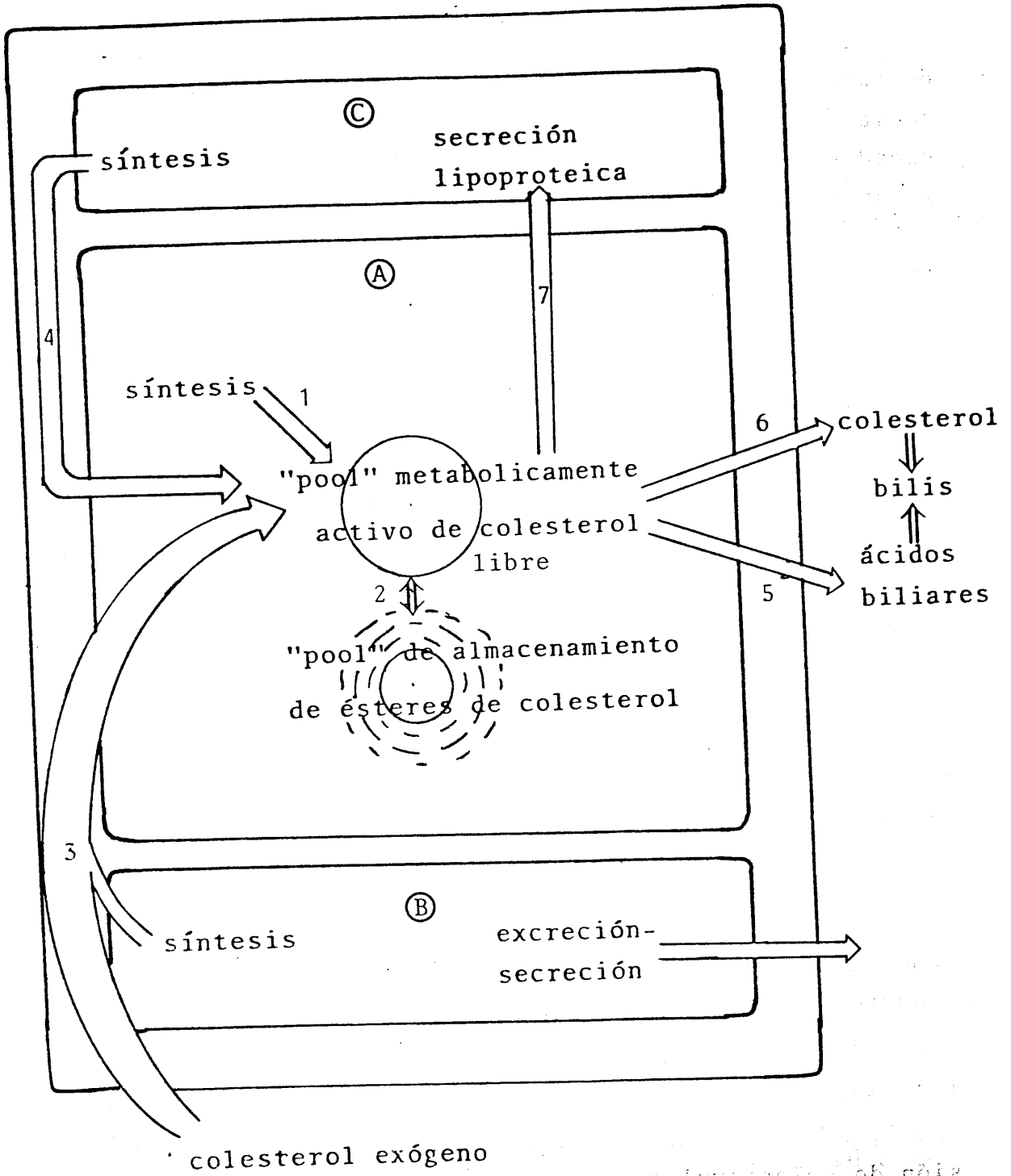
Takeuchi y col (22) demuestran una diferencia entre el hígado de ratas jóvenes y adultas en cuanto a la eficiencia de utilización de acetato para la síntesis de colesterol. Así, la actividad sintética es 10 veces mayor en ratas jóvenes que adultas y establecen que la regulación de la síntesis de colesterol en ratas adultas es menos sensitiva tanto a la supresión como a la estimulación.

1. A. 4. 3. - Regulación

En el esquema nº 3 (145) está representado un modelo simplificado que describe los procesos implicados en el mantenimiento del balance de colesterol a través del hígado y cómo éstos están relacionados con la regulación de la salida del colesterol biliar en la rata. El cuerpo está representado por tres compartimentos: (A) - el hígado; (B) - el intestino; (C) - el resto del cuerpo, incluida la sangre. El hígado contiene un "pool" metabólicamente activo de colesterol libre que se halla en equilibrio con el "pool" de ésteres de colesterol 2. El tamaño de este último puede variar grandemente dependiendo del estado metabólico del hígado.

El colesterol que ingresa al "pool" activo de colesterol libre es derivado fundamentalmente de síntesis endógena 1, síntesis en el intestino junto con el colesterol procedente de la dieta 3 y síntesis en el resto del cuerpo 4.

La entrada de colesterol a este "pool" está regulada por salida mediante tres rutas: secreción de lipoproteínas 7, secreción de colesterol libre en la bilis 6 y conversión de colesterol en ácidos biliares y su subsiguiente secreción en bilis 5.



Esquema nº 3

Los estudios efectuados sobre los mecanismos de regulación de síntesis de esteroides se han efectuado principalmente mediante técnicas "in vitro". La síntesis de colesterol ha mostrado en hígado un significativo ritmo diurno (157, 158), es marcadamente aumentada por stress (139, 157), por interrupción de la circulación enterohepática (157) o por alimentación de colestiramina (43, 83) y es suprimida por ayuno (83, 137, 153, 157), por una alimentación rica en colesterol (41, 43, 83) y por alimentación de ácidos biliares (159, 160). La síntesis hepática de colesterol está también regulada por los niveles plasmáticos de los principales tipos de lipoproteínas. En general existe una relación inversa entre la concentración de quilomicrones, HDL y LDL y la tasa de síntesis de esteroides en el hepatocito (161).

En contraste, la síntesis de esteroides en la mayor parte de los tejidos extrahepáticos no manifiesta ritmo diurno, no se suprime por quilomicrones circulantes y no se incrementa por stress o interrupción de la circulación enterohepática (70, 71, 157, 162). El ayuno reduce la actividad sintética en intestino, riñón y pulmón y la síntesis intestinal se incrementa marcadamente por interrupción de la circulación enterohepática (72, 157).

La tasa de síntesis de esteroides en tejidos endocrinos tales como glándula adrenal, ovario y testículos es extremadamente sensitiva a los niveles circulantes de HDL (163, 164), mientras LDL parecen ser principalmente responsables de la regulación de la síntesis de esteroides en tejidos tales como riñón, intestino delgado, colon y piel (162). Por ello en general la mayor parte de los tejidos tienen dos fuentes potenciales de colesterol para abastecer sus respectivas necesidades metabólicas. Sin embargo en presencia de niveles ade-



cuados de HDL y LDL circulantes puede usar preferencialmente la fuente de colesterol de las lipoproteínas y por ello suprimir la síntesis celular de colesterol. Este tipo de control recíproco puede explicar por qué en animales tales como rata, mono y hombre la tasa de síntesis de colesterol en la mayor parte de los tejidos es muy baja (70, 71, 165).

Los dos mecanismos reguladores de la colesterogénesis hepática de mayor interés fisiológico, tienen que ver con el mantenimiento del balance neto de esteroides en el cuerpo, incluyendo el nivel de colesterol que entra en el cuerpo a través del tracto gastrointestinal y el nivel de esteroides eliminado del cuerpo como ácidos biliares.

Según se ha indicado anteriormente la manipulación del colesterol de la dieta o el tamaño del "pool" biliar afecta profundamente a la síntesis hepática de colesterol pero existe controversia en cuanto a los mecanismos implicados en cada uno de estos efectos.

Shefer y col (160) han demostrado que la síntesis de colesterol en el hígado es suprimida por alimentación de ácidos biliares bajo circunstancias en las que la absorción de colesterol está total o parcialmente suprimida por β -sitosterol. Alternativamente, la síntesis hepática de colesterol se ha encontrado que aumenta tras resección del ileon terminal bajo circunstancias en que la absorción de éste aparentemente no cambia (85). Estos estudios han propuesto la posibilidad de que los ácidos biliares puedan tener un efecto regulador directo sobre la HMG CoA reductasa dentro de hepatocito. Nervi y Dietschy (166) indican, sin embargo, que los ácidos biliares no tienen efecto sobre la HMG CoA reductasa dentro del hepatocito y que su efecto puede ser indirecto alterando la

tasa de síntesis de colesterol ya que el tamaño del "pool" biliar altera el nivel de colesterol transformado en ácidos biliares y por lo tanto eliminado en la bilis.

Datos actuales sugieren que la tasa de síntesis de colesterol en el hígado está estrechamente determinada por el "pool" intracelular de esteroides que responden a cambios en la tasa de entrada y salida del hepatocito.

En animales con una dieta con un bajo contenido en colesterol, la entrada de éste al hepatocito ocurre principalmente por toma de LDL, residuos de quilomicrones, VLDL, y en menor tasa de HDL (167). Bajo estas circunstancias, la toma neta de colesterol es relativamente baja existiendo poca acumulación de ésteres de colesterol y su síntesis ocurre a una tasa significativa pero media.

Tras la adición de colesterol a la dieta existe un marcado aumento en la entrada de colesterol desde el intestino al plasma transportado por los quilomicrones. Estas lipoproteínas son metabolizadas parcialmente por la lipoproteína lipasa (168, 169) y el residuo es tomado a gran velocidad por el hígado mediante un sistema de transporte localizado en la membrana sinusoidal de la célula hepática (167).

La tasa de entrada de estos residuos de quilomicrones es usualmente mucho mayor que la tasa a la que el colesterol puede ser dispuesto, de tal forma que gran parte del colesterol que ingresa en la célula es almacenado como colesterol esterificado y existe una supresión recíproca de síntesis "de novo" de colesterol (161, 170). En estas circunstancias el colesterol absorbido por el intestino más el sintetizado "de novo" puede ser el mejor sustrato para las necesidades de colesterol de la célula.

1. A. 5.- PAPEL DEL RIÑON EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

En el animal adulto el colesterol del riñón supone un porcentaje muy bajo del colesterol total del cuerpo (41). Según se ha observado en cultivo de células renales, el colesterol es el principal esterol presente en éstas (171). En el caso del pollo (100) gran parte de este colesterol se halla en forma libre (75-90%) y no parecen existir grandes variaciones ni en los niveles de colesterol, ni en los porcentajes de colesterol libre y esterificado a lo largo de la edad.

Los niveles de colesterol en riñón no resultan ser afectados por tratamiento dietario. Así, una dieta rica en colesterol y sebo no los afecta (41), aunque sí se ha observado que el ayuno reduce los niveles de colesterol en riñón (157) y que el stress los incrementa de forma transitoria (172).

Según se deduce de los estudios de Giraud-Hollander y col (2) el colesterol renal es tomado del plasma simultáneamente en forma libre y esterificada desde los tres tipos de lipoproteínas, fundamentalmente de HDL, indicándose que dentro de este órgano a diferencia del hígado no existe ni hidrólisis de la forma esterificada ni esterificación del colesterol libre ni tampoco intercambio entre las formas libres y esterificadas.

1. A. 5. 1.- Utilización del ácido mevalónico

Durante el desarrollo embrionario del pollo existen tres órganos excretores separados y sucesivos. El pronefros es rudimentario y no funciona como un órgano excretor pero su desarrollo es esencial para el desarrollo posterior del mesonefros y metanefros. El pronefros es un órgano vestigial y empieza a degenerar muy tempranamente. En embrión de pollo (34), el

mesonefros aumenta su volumen unas doce veces y empieza a degenerar hacia el día 12 siendo funcional ya el día 5º de incubación. El metanefros es el riñón definitivo de aves, reptiles y mamíferos. Empieza su desarrollo sobre el 4º día de incubación. Los túbulos secretores se desarrollan hacia la zona interna de tal forma que hacia el día 11 ya están formados y empiezan a funcionar.

El riñón es un complejo tejido con un alto grado de especialización en función de las secciones individuales de su estructura básica: la nefrona. Esta diferenciación es obvia por las diferencias observadas en el metabolismo del cortex (que comprende glomérulos y túbulos contorneados distales y proximales) y la médula que contiene asas de Henle y los conductos colectores. La conversión de MVA "in vitro" a escualeno y esteroides en riñón de rata está confinada casi enteramente al cortex, concretamente a los túbulos contorneados distales y proximales (173), aunque "in vitro" (174) el 90% de la actividad sintética se localizó en los glomérulos. Esto es debido posiblemente a una diferencia en la ruta por la que el sustrato alcanza los túbulos renales "in vitro" e "in vivo".

Usualmente se ha considerado que la contribución de los tejidos extrahepáticos (excepto el intestino) a la colesteroogénesis del individuo es muy baja (70, 71). Sin embargo, estudios recientes usando agua tritiada (152) han indicado una mayor contribución de los tejidos extrahepáticos que la que se aceptaba hasta el momento.

Tras inyección subcutánea de 2^{14} -C-MVA Edmond (119) detectó una incorporación muy elevada desde este sustrato a esteroides, incorporación que excedía incluso a la experimentada por el hígado. Estos hechos corroboran los resultados de Edgren y col (175) de que la toma de MVA por el riñón excede

a la del hígado en ratón adulto. La elevada toma de MVA circulante (13% en los dos riñones) es tanto más sorprendente puesto que la incorporación de acetato es prácticamente nula (117, 119). Esto podría suponer que el riñón tiene sólo capacidad limitada para sintetizar MVA desde acetato mientras que las etapas subsiguientes que son responsables de la conversión de MVA a precursores de colesterol no saponificables se llevan a cabo de forma efectiva por el riñón (117).

Puesto que el riñón es un órgano excretor con función depuradora, está expuesto a una elevada concentración de MVA; por lo tanto, la gran eficiencia en la toma de MVA circulante puede no ser tanto un reflejo de un activo metabolismo de esteroides como de su función excretora. (119, 176).

Wiley y col (177) han indicado que la ruta desde MVA a esteroides supone un 74% del MVA metabolizado. Sus estudios confirman que el riñón representa el lugar primario de conversión de MVA circulante a esteroides y precursores de esteroides. Tras seis horas de administración de MVA el mayor producto final del metabolismo del MVA es el colesterol detectándose un 9% en lanosterol y un 15% en escualeno.

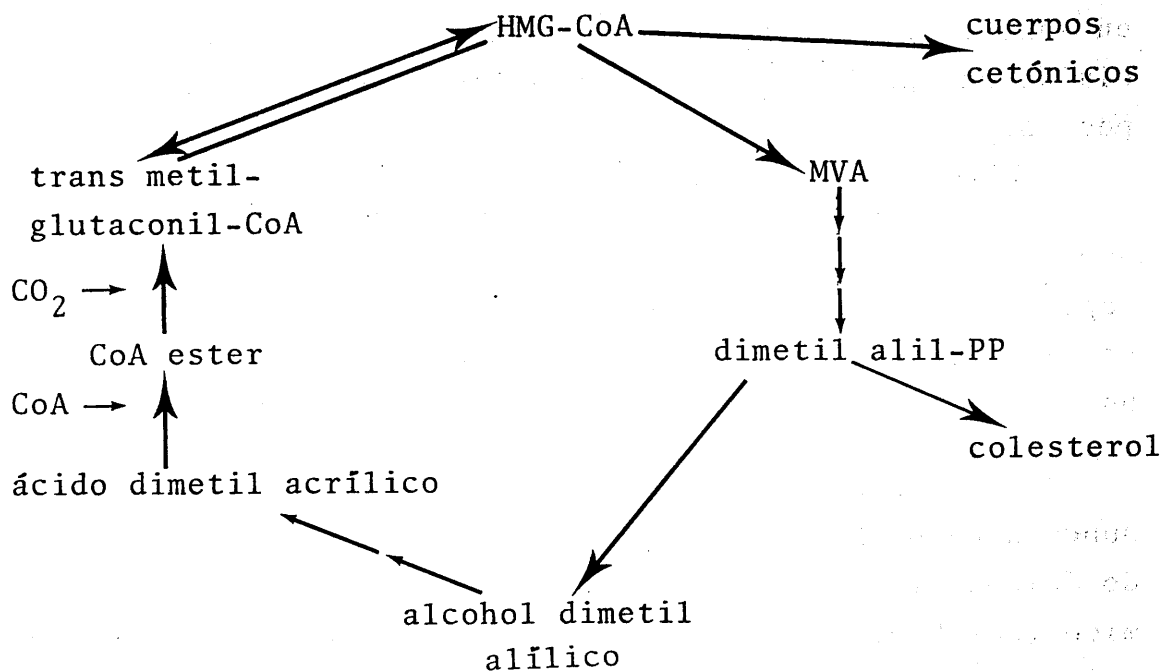
Sin embargo Hellstrom y col (117) a diferencia de Wiley indican que la mayor parte de la radiactividad detectada en riñón a partir de MVA aparece como escualeno (65%) y lanosterol (21%). También se ha demostrado en cultivo de células renales (171) que la biosíntesis de colesterol, en este caso, se caracteriza por una baja conversión de precursores a colesterol observándose una acumulación de lanosterol y esteroides de 27 átomos de carbono. Parece probable que el riñón pueda ceder parte de estos precursores a la circulación para ser conducidos al hígado donde serían convertidos en colesterol.

Goodman (178) detecta cantidades significativas de escualeno en sangre de rata y hombre, lo que podría indicar la existencia de un "pool" activo de escualeno circulante en estas especies.

Los estudios de Gold y Olson (179) han mostrado que cortes de riñón convierten MVA a coenzima Q a una tasa más rápida que hígado o corazón y que esta capacidad (que en riñón es 1/10 de la capacidad de síntesis de colesterol) supondría un 1% del MVA metabolizado por el tejido renal.

Edmond y Popjak (180) observaron tras inyección subcutánea de MVA, en ratas de 9 días, un marcaje preferencial de ácidos grasos de cadena larga en tejidos de origen ectodérmico (cerebro, médula espinal y piel). Esto sugirió la posible existencia de un desvío o "shunt" de la ruta metabólica conducente a esteroides desde MVA que daría lugar a cuerpos cetónicos que serían usados preferencialmente por el cerebro en desarrollo, no sólo como fuente de energía sino también de átomos de carbono para la síntesis de lípidos.

Se han postulado 3 posibles vías por las que se podría producir este desvío (180). De ellas la más probable parece ser la que ocurriría por acumulación del dimetil alil pirofosfato por inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa (prenil transferasa) que cataliza la síntesis de geranyl y farnesil pirofosfato. El dimetil alil pirofosfato por una serie de etapas intermedias daría lugar a la formación de HMG-CoA que podría ser usado para la síntesis de cuerpos cetónicos. Esquema nº 4.



Esquema nº 4

Riguetti y col (181) han usado la producción de ¹⁴CO₂ desde 2-¹⁴C-MVA y 5-¹⁴C-MVA como un ensayo más sensible para la determinación del "shunt" ya que con la técnica anterior, en tejidos que sintetizan ácidos grasos más pobremente que el cerebro podría no detectarse este "shunt".

Efectivamente, mediante esta técnica se ha comprobado que también el riñón es el órgano más activo en la ruta del "shunt", metabolizando de esta forma una cantidad de MVA 21 veces superior al resto de los tejidos examinados. El "shunt" sin embargo fué de poca importancia o indetectable en cerebro e hígado.

El metabolismo renal del MVA por la ruta no conducente a esteroides parece ser un proceso muy rápido ya que Fogelman y col (182) tras la inyección intravenosa de 5-¹⁴C-MVA en ratas y hombre observaron ¹⁴CO₂ en la respiración. En cortes de tejidos de becerros (183) los dos órganos más activos en la conversión de MVA circulante a lípidos insaponificables fueron la médula renal y el tejido adiposo. Sin embargo la corteza renal resulta ser el tejido primordial en la utilización de MVA por la ruta no conducente a esteroides llegando a producir de 15 -80 veces más CO₂ que cualquier otro tejido.

1. A. 5. 2.- Regulación

De los estudios efectuados hasta el momento parece deducirse que existe inhibición "feed-back" en la biosíntesis de colesterol en riñón por administración de una dieta con un elevado contenido en colesterol, aunque esta inhibición por colesterol exógeno es menos patente que la detectada en hígado.

Thompson y col (41) detectan en cabra una reducción de un 25% en la colesterogénesis renal por alimentación de colesterol y sebo aunque no se observan variaciones en la concentración de colesterol en el riñón.

Fears y Umpleby (184), usando ³H₂O para determinar "in vivo" la tasa de colesterogénesis en distintos tejidos, comprueban que la contribución de la colesterogénesis renal al nivel de colesterol del cuerpo es mucho menor que la del hígado. Observan, asimismo, inhibición de la síntesis de colesterol en tejido extrahepático acompañada de un aumento en los niveles de colesterol esterificado. El cambio coordinado en la biosíntesis de colesterol y en el nivel de colesterol esterificado sin cambio en el contenido en colesterol

total de tejidos extrahepáticos se atribuye al control de la toma de lipoproteínas mediada por un receptor.

También en rata se ha comprobado que la alimentación de colesterol lleva consigo una reducción en la incorporación renal desde acetato a esteroides aunque no se ha observado, en este caso, un aumento en la concentración tisular de colesterol (185). En cultivo de células de riñón (171) se observa que, en ausencia de colesterol exógeno, las células renales crecen más lentamente produciéndose una disminución en el contenido intracelular de colesterol aunque se observa un aumento en la incorporación de acetato a esteroides. Esto sugiere que en cultivo celular la tasa de formación de esteroides en riñón está influenciada por la concentración de colesterol exógeno. La acumulación de colesterol observada en carcinomas renales, que parece ser de origen endógeno (186), no tiene que ser debida precisamente a una regulación aberrante de la síntesis de colesterol según se desprende de los estudios de González y col (187).

Tras nefrectomía (173) o en ratas nefróticas (175) se ha observado un aumento en la conversión de MVA a lípidos insaponificables en hígado. La nefrectomía (173, 177) produce una reducción de un 60% en el metabolismo del MVA por la ruta del "shunt". Esto parece indicar en condiciones donde existe una disminución en la utilización del MVA circulante, que otros tejidos extrarrenales podrían sustituir al riñón en esta función, pero sin embargo no son capaces de asumir el papel del riñón en el metabolismo del MVA por la ruta no conducente a esteroides.

Parece ser que el lugar prioritario en la producción de MVA lo ocupa el hígado (117, 188); por ello en condiciones de gran cantidad de colesterol exógeno se observa una disminución en la concentración de MVA circulante y una reducción en la conversión de acetato a MVA en el hígado (188) probablemente debido a la inducción del sistema "feed-back" por el colesterol de la dieta en hígado. Por ello de forma indirecta la síntesis renal de esteroides puede estar controlada en parte por este mecanismo.

El HMG-CoA es un intermediario en los rutas primarias de síntesis de colesterol y forma parte de la síntesis de colesterol en los tejidos animales. Basándose en estos hechos se propone que el HMG-CoA sería sintetizado en común por la acetil-CoA y la acetil-CoA en la síntesis de colesterol y la síntesis de HMG-CoA en la síntesis de colesterol.

El HMG-CoA es un intermediario en los rutas primarias de síntesis de colesterol y forma parte de la síntesis de colesterol en los tejidos animales. Basándose en estos hechos se propone que el HMG-CoA sería sintetizado en común por la acetil-CoA y la acetil-CoA en la síntesis de colesterol y la síntesis de HMG-CoA en la síntesis de colesterol.

La acetil-CoA y la acetil-CoA en la síntesis de colesterol y la síntesis de HMG-CoA en la síntesis de colesterol.

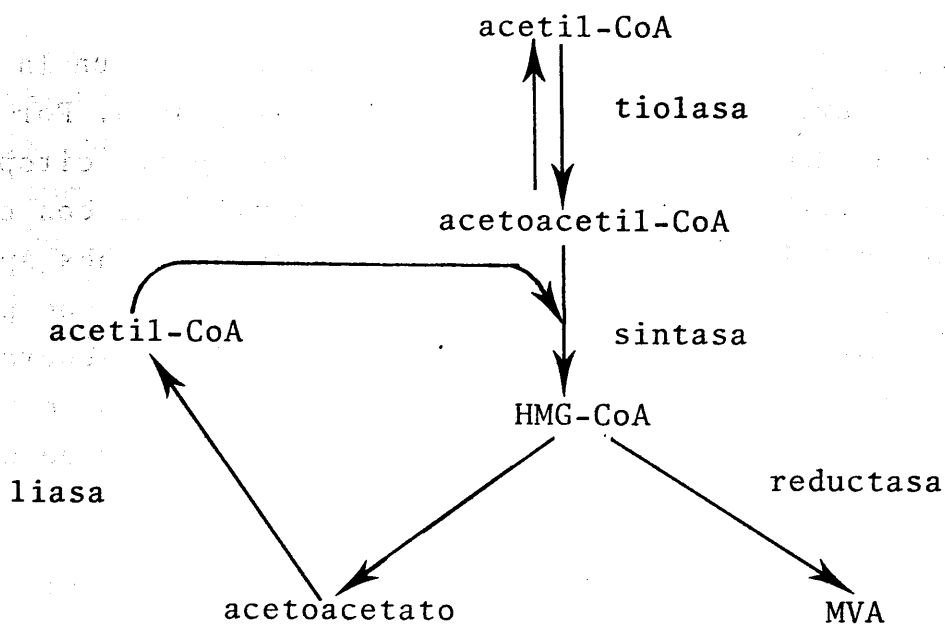
1. B.- RUTA BIOSINTETICA DEL COLESTEROL

1. B. 1.- SINTESIS DE HMG-CoA

El mecanismo de biosíntesis de colesterol ha podido ser demostrado mediante el empleo de radioisótopos. Todos los átomos de carbono del colesterol proceden del acetato, unos del grupo metilo, otros del carboxílico. El punto de partida de las reacciones de biosíntesis de colesterol es el acetil-CoA mediante condensación de dos moléculas gracias a una acetil transferasa del tipo β -cetolasa (acetoacetil-CoA tiolasa) para dar acetoacetil-CoA y CoA libre. Sobre una molécula de acetoacetil-CoA se fija un tercer grupo acético mediante la HMG-CoA sintasa obteniéndose de esta forma HMG-CoA.

El HMG-CoA es un intermediario en dos rutas principales en tejidos animales: síntesis de colesterol y formación de cuerpos cetónicos. Basándose en estos hechos se propuso inicialmente que el HMG-CoA sería sintetizado en común para la colesterogénesis y la cetogénesis y que el punto de desvío entre estas 2 rutas ocurriría en la primera reacción de cada ruta a partir de HMG-CoA: por una parte, obtención de MVA mediante una reductasa específica microsomal y por otra el paso de HMG-CoA a acetoacetato mediante la HMG-CoA liasa (esquema nº 5).

La acetoacetil-CoA tiolasa y la HMG-CoA sintasa que constituyen el sistema generador de HMG-CoA exhiben una localización doble: mitocondrial y citoplasmática. En contraste, la HMG-CoA liasa parece estar localizada en la mitocondria (189).



Esquema nº 5

Todo esto indica que la colesterogénesis se realiza en el citoplasma celular mientras que la cetogénesis está restringida a la mitocondria. Sólo se ha detectado importante actividad HMG-CoA sintasa mitocondrial en riñón e hígado, por lo tanto se propone que únicamente estos dos tejidos son capaces de generar acetoacetato, ya que en ellos no existe un bloqueo en la HMG-CoA sintasa mitocondrial (189).

Clinkenbeard y col (190) han demostrado que la tiolasa posee propiedades moleculares distintas en su localización citoplasmática y mitocondrial. También existe evidencia de que la HMG-CoA sintasa citoplasmática y mitocondrial son proteínas distintas (191).

Puesto que la membrana mitocondrial es impermeable a los acil-CoA derivados, el HMG-CoA generado en la mitocondria no parece ser usado a nivel del citoplasma. Por otra parte, se ha demostrado la existencia de un "pool" citoplasmático de acetil-CoA que no se halla en equilibrio con el "pool" de acetil-CoA mitocondrial. Todos estos hechos apoyan la evidencia de que cetogénesis y colesterogénesis son procesos distintos en su localización y que el HMG-CoA generado en la mitocondria es usado para la formación de cuerpos cetónicos, mientras que el citoplasmático sirve como precursor de colesterol.

La distribución de la acetoacetil-CoA tiolasa está relacionada con la capacidad sintética del tejido (192). Así el hígado de pollo, seguido del cerebro de rata recién nacida presenta la mayor actividad. Sin embargo en embrión de pollo se ha detectado, tanto en cerebro como en hígado, menor actividad acetoacetil-CoA tiolasa en el momento de la eclosión que en los días 11-12 de desarrollo embrionario, mientras que en la actividad de esta enzima en la fracción mitocondrial sufre un brusco aumento en los últimos días de desarrollo embrionario en ambos órganos (193).

Ultimamente se ha concedido gran importancia a la HMG-CoA sintasa citoplasmática en cuanto a la regulación de la colesterogénesis ya que se ha demostrado que es marcadamente deprimida por alimentación de colesterol (191-194). Mizioroko y Lane (195) han sugerido que la acetilación de la HMG-CoA sintasa es la etapa limitante en la síntesis de HMG-CoA, como lo es también en la cetogénesis (196).

Chang y Limanek (197) han detectado mediante cultivo celular un aumento de las actividades acetoacetil-CoA

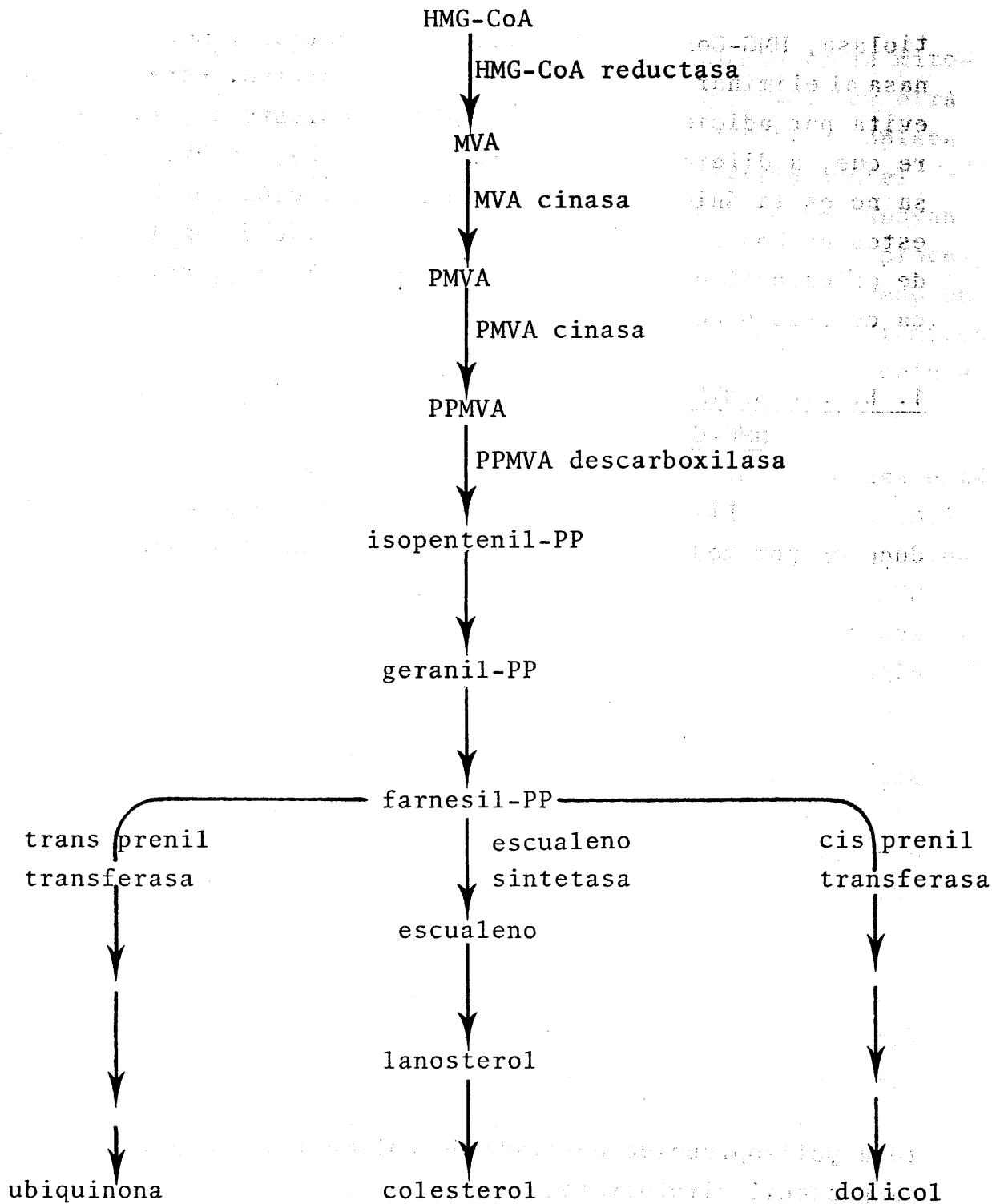
tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y mevalonato cinasa al eliminar lípidos del medio de cultivo. Este aumento se evita por adición de LDL o 25-hidroxicolesterol, lo que sugiere que, a diferencia de lo que se pensaba, la HMG-CoA reductasa no es la única enzima sujeta a regulación por LDL. Todos estos hechos apoyan la idea de una regulación en la síntesis de colesterol desde acetato a nivel de la activación citosólica de este precursor (198).

1. B. 2.- SINTESIS DE COMPUESTOS ISOPRENOIDES A PARTIR DE HMG-CoA

El HMG-CoA generado en el citoplasma sufre una reducción por medio de la HMG-CoA reductasa microsomal para dar MVA. Esta enzima se ha considerado desde los estudios iniciales como punto limitante en la biosíntesis de colesterol en hígado en la mayor parte de las condiciones (199).

En el esquema nº 6 se ha representado de forma simplificada la ruta ramificada del metabolismo del MVA como se aclaró para el hígado de mamíferos a través de los estudios clásicos de Block, Popjak y otros (200, 201, 202, 203, 204).

Una ruta semejante, si no idéntica, se ha demostrado en cultivo celular. En fibroblastos y células de mamíferos el MVA marcado es convertido en tres productos finales: colesterol, dolicol y la cadena polisoprenoide de la ubiquinona (205, 206). Cada uno de estos compuestos tienen una estructura polisoprenoide derivada de polimerizaciones repetidas del isopentenil pirofosfato.



Esquema nº 6

En la reacción de polimerización inicial, el isopentenil-PP se acopla con su isómero dimetil alil PP en una condensación cabeza-cola para formar el intermediario de 10 átomos de carbono, geranil-PP. Este reacciona con otra molécula de isopentenil-PP en otra condensación cabeza-cola para formar el farnesil-PP.

De acuerdo con la evidencia actual el farnesil-PP constituye el principal punto de ramificación en la biosíntesis de poliisoprenoides (201, 202) ya que puede participar en tres reacciones enzimáticas distintas:

a) dos moléculas de farnesil-PP se pueden condensar cabeza con cabeza para formar escualeno, compuesto de 30 átomos de carbono que es el primer intermediario en la ruta biosintética de esteroides (203). Esta reacción enzimática es catalizada por la escualeno sintetasa.

b) La cadena de farnesil-PP puede aumentar por condensaciones repetidas cabeza-cola con grupos de isopentenil-PP, mediante una trans prenil transferasa, para formar poliprenoles de larga cadena donde todos los dobles enlaces están en posición trans. Cuando la longitud de la cadena alcanza 10 unidades isoprenoides los grupos poliprenoles se transfieren a un anillo aromático derivado de la tirosina para iniciar la síntesis de ubiquinona (204).

c) El farnesil-PP, por otra parte, se puede convertir en un alcohol poliisoprenílico, el dolicol (202).

La producción de MVA es estrechamente controlada para producir suficiente isopentenil-PP y farnesil-PP para satisfacer los requerimientos celulares de los tres productos finales del metabolismo del MVA. El mecanismo de control se realiza a nivel de la HMG-CoA reductasa, mediado por colesterol derivado de LDL, a través de un tipo de regulación "feed-back" negativa (205, 207).

1. C. - ENZIMAS IMPLICADAS EN LA SINTESIS, FOSFORILACION Y DES-CARBOXILACION DEL ACIDO MEVALONICO

1. C. 1. - HMG-CoA REDUCTASA

De todas las reacciones antes mencionadas, la catalizada por HMG-CoA reductasa ha sido la más estudiada, debido a la amplia evidencia acumulada de que este enzima es el punto de control más importante en la biosíntesis de colesterol (69, 208). Tanto es así que la capacidad colesterogénica de un tejido se ha medido tanto por la velocidad de utilización por el tejido de distintos precursores del colesterol, como por la actividad de la HMG-CoA reductasa.

1. C. 1. 1. - Distribución y localización de la enzima

La mayor parte de los estudios efectuados se han realizado en mamíferos, concretamente en rata, y gran cantidad de tejidos han mostrado poseer actividad HMG-CoA reductasa, especialmente hígado, intestino y cerebro (199). En intestino de rata la HMG-CoA reductasa de las células de las criptas y de las vellosidades tienen propiedades semejantes (209) y responden a las condiciones dietarias de la misma forma (210), aunque la enzima de yeyuno es menos activa que la de ileon (209). Se ha demostrado también actividad reductasa en cultivo de fibroblastos (211) y linfocitos humanos (212), así como en cultivo de distintas líneas celulares (213).

En hígado de rata la actividad reductasa parece estar localizada en la fracción microsomal exclusivamente; sin embargo en las criptas de la mucosa intestinal también se ha localizado actividad reductasa en la fracción mitocondrial (214). En cerebro, se ha observado que la actividad reductasa

no es exclusivamente microsomal indicándose que el 75% de la actividad total de la enzima en cerebro es de origen microsomal (215, 216).

En hígado y dentro de la fracción microsomal, un 80% de la enzima está asociada con la fracción correspondiente a retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y membrana plasmática (217). Sin embargo recientemente se ha señalado que dentro de la fracción microsomal el reparto no es homogéneo, sino que se presenta fundamentalmente en secciones del retículo endoplasmático rugoso con ribosomas de baja densidad (218).

1. C. 1. 2. - Cambios en la actividad a lo largo del desarrollo

A pesar de que la HMG-CoA reductasa se ha estudiado repetidamente en hígado y otros tejidos de mamíferos, en cerebro poco se conoce sobre ésta y otras enzimas implicadas en la biosíntesis de colesterol, y los pocos estudios efectuados son a veces contradictorios.

Aragon y col (216) observaron en rata un aumento en la actividad de la enzima en el cerebro completo desde el nacimiento hasta los diez días para disminuir más tarde hasta valores adultos. En la fracción microsomal, sin embargo, se observó un pico máximo de actividad entre los 8 y 12 días y un segundo pico a los 20 días. En contraste, Kandutsch y Saucier (118) observaron que la actividad reductasa, en cerebro de ratón, es máxima en el nacimiento y disminuye posteriormente de forma casi lineal. Este patrón de desarrollo de actividad reductasa no coincide con la incorporación de acetato y MVA observada por estos mismos autores ya que la velocidad de incorporación fue máxima a los 11 días del nacimiento. Esto les llevó a postular que, en cerebro, la HMG-CoA reductasa regula la tasa de síntesis de esteroides desde acetato sólo

en el período de 11 días en adelante, cuando la síntesis está declinando pero no entre 1 y 11 días de edad.

Maltese y Volpe (219) observan un distinto patrón de desarrollo de la reductasa en cerebro, dependiendo de la forma de exposición de la actividad enzimática. Así demostraron que la actividad específica de la reductasa disminuye desde el cuarto día del nacimiento, mientras que si se refiere la actividad a un cerebro completo, aumenta ésta rápidamente como cabría esperar en base al gran aumento en el contenido en colesterol en cerebro durante este período.

La demostración de la capacidad de activación de la HMG-CoA reductasa en homogenados de cerebro, tiene implicaciones importantes en los estudios de desarrollo de esta enzima. Se ha sugerido (219) que la regulación de la reductasa a nivel de la eficiencia catalítica puede ser de particular importancia en el desarrollo del cerebro. Esta sugerencia es compatible con el hecho de que el período en que la capacidad de activación de la reductasa es mayor (de 4 a 10 días) se correlaciona bien con el período en que la incorporación de acetato a colesterol es más activa en el desarrollo del cerebro de ratón (118).

Las altas actividades observadas en cerebro de ratas jóvenes, comparadas con las de adulto, (215) pueden explicar la elevada tasa de síntesis de colesterol en el desarrollo del cerebro comparado con el adulto. Esto podría tener una influencia directa en el proceso de mielinización ya que se ha sugerido que la disponibilidad de esteroides en el cerebro es la etapa limitante en la formación de mielina. Esta sugerencia está de acuerdo con la observación de la capacidad de colesterogénesis en ratones mutantes que presentan

una mielinización defectiva. En estos ratones tanto la capacidad de síntesis de colesterol a partir de acetato como la actividad reductasa está muy disminuida con respecto a los controles (118).

En los estudios efectuados (220, 221) durante el período perinatal de rata, se observa que la actividad reductasa en hígado fetal varía de forma recíproca a los niveles de colesterol del suero existiendo 2 picos de actividad reductasa, uno cuatro días antes del nacimiento y otro tras el destete, donde se alcanzan niveles de actividad considerablemente superiores a los del hígado adulto. Los períodos de menor actividad coinciden con las etapas donde existe un elevado nivel de colesterol en suero debido a la leche materna. En cerebro (220) se observa un pico de máxima actividad a los 4 días tras el nacimiento, para disminuir posteriormente. Comparando los patrones de desarrollo en la reductasa microsomal de hígado, cerebro y pulmón, es evidente que la enzima no se halla regulada coordinadamente, y más aún, que la actividad enzimática parece estar relacionada con las demandas fisiológicas de cada tejido para síntesis de colesterol.

Se ha indicado que existe una correlación inversa entre colesterol hepático y actividad reductasa (222). Sin embargo McNamara y col (221) concluyen de su estudio que es improbable que el patrón de desarrollo de la reductasa sea el resultado de grandes cambios en la concentración de colesterol hepático, sino que son causados fundamentalmente por factores dietarios, sugiriéndose que a diferencia del cerebro, la reductasa hepática es la enzima limitante de la síntesis de colesterol durante el desarrollo pre y postnatal.

En pollo, en un estudio efectuado durante el período postnatal, Alejandre y col (223) concluyen que el patrón de desarrollo observado en la reductasa de cerebro, hígado e intestino es distinto. La enzima en cerebro presenta elevados niveles de actividad, pero no varía apreciablemente durante las dos primeras semanas de vida postnatal. Por el contrario, la enzima hepática, que presenta niveles mínimos de actividad los primeros días tras la eclosión, sufre un brusco aumento hacia los días 4-5 alcanzando niveles superiores a los observados en cerebro. También la enzima de intestino sufre un aumento de actividad hacia el día 4-5 pero alcanza niveles de actividad muy inferiores a los observados para el cerebro. Los cambios detectados en la reductasa hepática e intestinal están relacionados con las condiciones nutricionales del pollo mientras que la enzima de cerebro parece actuar, como en el caso de la rata, independientemente de los factores nutricionales.

1. C. 1. 3. - Regulación de la HMG-CoA reductasa

1. C. 1. 3. 1. - Modulación covalente

A partir de los estudios realizados recientemente parece acertado suponer que la HMG-CoA reductasa se halla sujeta a un mecanismo de modificación en su actividad por interconversión de una forma activa a una inactiva mediante mecanismos de fosforilación-defosforilación. Así, en primer lugar se mostró que la HMG-CoA reductasa era inactivada por una enzima citosólica dependiente de ATP (224, 225). Más tarde se demostró que la actividad enzimática se restauraba por incubación de una enzima citoplasmática en presencia de EDTA (226) ó bien mediante una fosfoproteína fosfatasa hepática parcialmente purificada (227).

Recientemente se ha demostrado la existencia de una HMG-CoA reductasa fosfatasa (228) y una HMG-CoA reductasa cina-
sa (229), ambas citoplasmáticas, que intervendrían en el pro-
ceso de activación - inhibición de la reductasa microsomal.
Los enzimas citoplasmáticos serían interconvertibles, a su vez,
en formas activas e inactivas por mecanismos de fosforilación
-defosforilación. De esta forma aparece este mecanismo como
un modelo muy sofisticado de regulación de biosíntesis de co-
lesterol.

Kleinsek (230) ha demostrado recientemente que la HMG-CoA reductasa microsomal activa es modificada a una espe-
cie inactiva en presencia de ATP, Mg^{2+} y una proteína citoplas-
mática, y que este proceso de inactivación envuelve una modi-
ficación de la enzima activa preexistente, pero la significa-
ción "in vivo" de esta reacción no se ha establecido. Estos
mismos autores demuestran que la HMG-CoA reductasa es modula-
da "in vivo" en estados de alimentación de colesterol o coles-
tiramina por cambios en la cantidad de enzima.

1. C. 1. 3. 2. - Regulación a nivel de membrana

En cultivo celular (231), los lípidos exógenos
disminuyen la biosíntesis de colesterol observándose un aumen-
to concomitante en la síntesis de colesterol esterificado sien-
do el colesterol exógeno el sustrato usado para esta esterifi-
cación. El contenido en colesterol de distintas membranas ce-
lulares puede ser variado experimentalmente y esto lleva con-
sigo cambios en la fluidez de la membrana (232). Algunos auto-
res (233) consideran que la fluidez de la membrana está rela-
cionada con los componentes químicos o moleculares de la cé-
lula, fundamentalmente con el colesterol o con la relación
molar colesterol / fosfolípidos, sugiriendo que el colesterol

es un importante factor en el control de la fluidez de las membranas celulares.

Partiendo de estos hechos Sabine y James (234) proponen que la fluidez de la membrana microsomal podría ser el efector crítico común en la regulación por dieta de la HMG-CoA reductasa y apoyan esta hipótesis por el cambio observado en la actividad HMG-CoA reductasa por modificación de la temperatura que afecta también lógicamente a la fluidez de los lípidos de la membrana. En estudios posteriores Sipat y col (235) observan cambios en la energía de activación sólo de un enzima microsomal, la HMG-CoA reductasa, mientras que el resto de los enzimas estudiados (7- α -hidroxilasa, colesterol acil transferasa y glucosa-6-fosfatasa) no fueron sensitivas a la variación de la fluidez de la membrana inducida por alimentación de colesterol. Por lo tanto parece ser que este mecanismo es específico para la reductasa.

Más tarde Sabine (236) observa en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con colesterol y ratas controles, que la síntesis de colesterol a partir de 1-¹⁴C-acetato muestra similares representaciones de Arrhenius y temperatura de transición que las observadas para la reductasa en ambos casos.

Mitropoulos y col (237) apoyan la hipótesis de Sabine y proponen que la actividad reductasa está regulada por cambios en la concentración de colesterol libre en el entorno lipídico de la enzima, que produciría cambios inmediatos en su actividad y propiedades. Esto podría ser seguido por cambios en la concentración de la enzima debido a alteraciones en la síntesis enzimática o a cambios en la tasa de asociación de

la enzima, recientemente sintetizada, a la membrana alterada por la concentración de colesterol libre. Alejandre (154) observa en pollo, tras suplementación de colesterol a la dieta, un marcado aumento de los niveles de colesterol en microsomas de hígado, así como un aumento de la relación molar colesterol/fosfolípidos y relaciona los cambios observados en los microsomas hepáticos con la disminución en la actividad HMG-CoA reductasa observada con el mismo tratamiento.

Otros autores, por el contrario (238) no detectan correlación entre la actividad HMG-CoA reductasa y el contenido en colesterol o ésteres de colesterol ni en la composición en ácidos grasos de los lípidos microsomales. Baqir y Booth (239) concluyen asimismo por tratamiento de ratas con una dieta al 2% de colesterol que el aumento observado en el contenido microsomal de esteroides no está implicado en la disminución de la actividad reductasa por el colesterol de la dieta.

Por todos estos hechos la hipótesis de modulación de la actividad HMG-CoA reductasa por cambios en la fluidez de la membrana está actualmente sujeta a gran controversia. Incluso los autores que la propusieron inicialmente, en un trabajo muy reciente (240) indican que es posible que este control mediado por la fluidez de la membrana no exista realmente.

1. C. 1. 3. 3. - Modulación por distintos efectores

La HMG-CoA reductasa, enzima conocida como principal punto regulador de la colesterogénesis en tejidos animales, es controlada por el estado nutricional y hormonal de los animales (199, 208).

Uno de los factores nutricionales que controlan la actividad de la enzima en el hígado es el nivel y naturaleza de las grasas dietarias. Ide y col (238) observan una dependencia de la actividad reductasa respecto a la longitud de la cadena y también al grado de insaturación de los ácidos grasos.

En todos los estudios realizados se le ha asignado un papel fundamental al colesterol como regulador de la actividad HMG-CoA reductasa a través de un mecanismo "feedback". La administración de colesterol exógeno a animales intactos (142, 222, 223, 239), fibroblastos (211) o hepatocitos aislados de rata (241) producen una inhibición de la actividad reductasa o de la incorporación de acetato a esteroides. Los niveles de actividad reductasa aumentan tras la infusión de dispersiones de lecitina a ratas (242) o tras la adición de dispersiones de lecitina a hepatocitos de rata (241). Las dispersiones de lecitina se ha demostrado que aumentan la tasa de salida del colesterol desde la célula al medio y se ha propuesto que las tasas relativas de salida y entrada de colesterol a la célula pueden ser críticas en la regulación de la actividad HMG-CoA reductasa y de la colesterogénesis (243). Si la regulación de la HMG-CoA reductasa es un mecanismo homeostático para mantener constante el contenido celular de esteroides como se ha propuesto (243, 244), el aumento en la concentración intracelular de colesterol debería llevar consigo una disminución en los niveles de actividad de la enzima. De hecho la actividad HMG-CoA reductasa es afectada por los esteroides sintetizados endógenamente tanto "in vitro" como "in vivo" (245) y se ha postulado la existencia de un "pool" de colesterol dentro del hepatocito que estaría implicado en la regulación de la actividad HMG-CoA reductasa. Asimismo en intestino, a pesar de que los ácidos biliares añadidos a la dieta

no afectan a la actividad HMG-CoA reductasa, la administración de colesterol y ácidos biliares induce una reducción apreciable en la actividad (246) que no es debida a un aumento en el flujo intestinal de ácidos biliares pero que está asociada con un aumento en la concentración de esteroides dentro de las células de las criptas intestinales.

Mediante el uso de anticuerpos de la enzima se ha indicado que la disminución de la actividad reductasa observada por efecto de la alimentación de colesterol, es debida inicialmente a la inactivación de la enzima preformada (243) ya que la disminución en la actividad es dependiente de una síntesis continuada de proteínas. Esta síntesis puede ser requerida para la toma de colesterol por la célula o para su conversión en alguna forma represora.

La imposibilidad de algunos investigadores para demostrar un efecto directo del colesterol sobre la HMG-CoA reductasa en preparaciones enzimáticas (208, 222) así como la ausencia de un inhibidor citoplasmático en hígado de ratas alimentadas con colesterol (222) sugieren que el colesterol no es, en sí mismo, un inhibidor fisiológico de la reductasa.

En estudios recientes se ha observado que el colesterol derivado de LDL es un supresor más potente que el colesterol libre (247). Por ello actualmente la atención de numerosas investigaciones se está centrando en el estudio de la regulación de la actividad reductasa por lipoproteínas fundamentalmente en fibroblastos y cultivo de distintos tipos celulares. Bajo las condiciones usuales de crecimiento de células en cultivo, fibroblastos humanos y otros tipos celulares expresan una baja actividad reductasa y producen colesterol y MVA en tasas mínimas (211, 248). Esto ocurre

porque las células usan sus receptores para autoabastecerse de colesterol desde las LDL presentes en el suero del medio de cultivo (248, 249) a través de un proceso de adsorción mediante endocitosis y su cesión posterior a los lisosomas. El colesterol liberado de la hidrólisis lisosomal de LDL abastece los requerimientos para síntesis de membrana y también suprime la actividad HMG-CoA reductasa por supresión aparentemente de la síntesis de moléculas enzimáticas (250).

Cuando los fibroblastos se transfieren a un medio en el que se ha eliminado LDL, las células desarrollan un marcado aumento en la actividad HMG-CoA reductasa que es paralelo al aumento en la síntesis de colesterol. La adición posterior de LDL al medio de cultivo suprime la actividad reductasa y la producción de MVA en un 98% como máximo, aunque la supresión no llega nunca al 100% (205, 207, 250).

Se ha sugerido que las células requieren al menos dos productos derivados del MVA para suprimir completamente la actividad reductasa. Uno de ellos, el colesterol, se requiere en niveles muy elevados y puede ser abastecido por LDL exógenas o por colesterol sintetizado endógenamente desde MVA (244), 250). El otro producto se requiere en niveles mucho menores y puede ser el MVA o un producto de su metabolismo (251).

Fibroblastos previamente incubados con compactina (un inhibidor competitivo de la reductasa) y LDL a los que se adiciona MVA, deprimen completamente su actividad reductasa. O bien debido a un aumento en la tasa de degradación irreversible de la enzima, a una inhibición en su síntesis o a ambos (251) cuando las LDL están ausentes del medio de cultivo la mayor parte del MVA sintetizado es incorporado a colesterol. Cuando se suprime la reductasa parcialmente por LDL, las células desvían el MVA formado preferencialmente a produc-

tos no esteroídicos. Así fibroblastos creciendo en presencia de LDL y compatina incorporan MVA preferencialmente a ubiquinona (205) de tal forma que esta síntesis aumenta en más de un 100% mientras la síntesis de colesterol a partir de MVA disminuye en un 95% (251).

Esto presenta evidencia de que células en cultivo pueden regular la síntesis de colesterol alterando la actividad de enzimas distales a la formación de MVA. De hecho, la adición de LDL a fibroblastos suprime la actividad escualeno sintetasa en un 90% (252) aunque de forma mucho menos rápida que la supresión observada para la reductasa (250, 252).

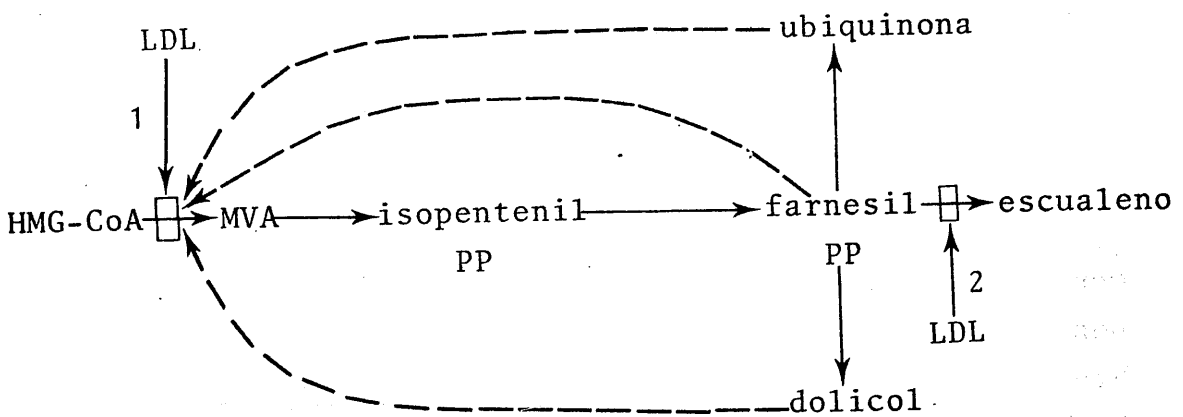
Los mecanismos que desvían el MVA a la ruta no esteroídica y los mecanismos que suprimen a la reductasa parecen ser coordinados puesto que la completa supresión de la actividad HMG-CoA reductasa no se realizan hasta que los requerimientos para la ruta esteroídica no están completos (205). Los esteroides oxigenados disueltos en etanol y añadidos al medio de cultivo suprimen la actividad reductasa (253) siendo tan efectivos como el colesterol derivado de LDL y aún mas que el colesterol disuelto en etanol. Estos esteroides oxigenados reproducen cada uno de los efectos producidos por LDL y sugiere que puedan actuar como análogos de colesterol uniéndose a los receptores intracelulares de esteroides (252).

El mecanismo por el que todas las sustancias antes mencionadas suprimen la reductasa es desconocido pero se supone que un mecanismo de control similar al observado en fibroblastos puede funcionar también en el hígado de mamíferos. Se ha indicado que la alimentación de colesterol a ratas disminuye la tasa de algunas etapas enzimáticas distales a MVA además de suprimir la actividad HMG-CoA reductasa (254). Un

lugar principal de regulación parece estar localizado en la conversión de farnesil-PP a escualeno. En fibroblastos, esta supresión puede funcionar para desviar metabolitos derivados de MVA a la ruta no esteroídica, y de hecho los estudios de Olson (204) indican que la síntesis de ubiquinona continúa ininterrumpidamente en hígado de rata aún cuando la alimentación de colesterol disminuye drásticamente la actividad reductasa y la síntesis de MVA.

Brown y Goldstein (251) han propuesto un mecanismo de regulación "feed-back" multivalente para la HMG-CoA reductasa que aparece indicado en el esquema nº 7.

El punto 1 indica la acción primaria del colesterol derivado de LDL a nivel de la HMG-CoA reductasa. El punto 2 indica el lugar secundario de acción del colesterol derivado de LDL. Las líneas discontinuas designan los compuestos que pueden actuar como reguladores no esteroídicos de la HMG-CoA reductasa.



Esquema nº 7

1. C. 2. - MEVALONATO CINASA

Levy y Popják (255) encontraron PMVA y PPMVA a partir de MVA y ATP en hígado de cerdo. La fosfomevalonato cinasa, enzima que cataliza la formación de PPMVA, fue separada completamente de la mevalonato cinasa mediante purificación. Tras purificación se demostró que la mevalonato cinasa es una enzima que posee grupos sulfhidrilos en su centro activo, dada su activación por cisteína en condiciones de aerobiosis.

Dorsey y Porter (256) estudiaron el efecto de distintos inhibidores tras la purificación de la enzima en hígado de cerdo. La mevalonato cinasa es inhibida por geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato, aunque precursores de éstos (isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato) no la inhiben. El hecho de que estos precursores no la inhiban a la misma concentración indica que la inhibición es completamente selectiva.

Ramachandran y Shah (257) han estudiado las propiedades de la mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa en el sobrenadante de 105.000 x g de cerebro de rata. Ambas enzimas precisan Mg^{2+} y ATP para su actividad óptima, así como un pH de 6.5-8. González - Pacanowska y col (258) determinaron, asimismo en cerebro de pollo, la dependencia de la mevalonato cinasa de Mg^{2+} y ATP para la máxima actividad. El pH óptimo en este caso fue de 9.2 para ambas enzimas.

En cerebro de rata (257) la mevalonato cinasa no experimenta variaciones en su actividad con la edad, aunque sí se ha observado un cambio en la Km de la enzima desde el nacimiento hasta los 52 días de edad. En pollo, por el contrario se ha demostrado una variación en la actividad meva-

lonato cinasa a lo largo del desarrollo postnatal en cerebro y riñón (259). En ambos órganos la actividad de la enzima no varía de forma apreciable en los cuatro días posteriores a la eclosión pero en el 4º y 6º día se observa una acusada disminución. La actividad de la enzima ha resultado muy superior en cerebro que en riñón.

En hígado de pollo, el patrón de desarrollo observado en la actividad mevalonato cinasa (260) es distinto al indicado para la misma enzima en cerebro o riñón. En el hígado la enzima, que presenta niveles bajos de actividad los primeros días de desarrollo postnatal, sufre un marcado aumento en su actividad hacia el día 7º tras la eclosión. En hígado de rata, por el contrario, Ramachandran y Shah (261) estudiando la fosforilación del MVA en el sobrenadante procedente de centrifugación a 105.000 x g de ratas lactantes y destetadas no observan variación en la actividad de la enzima, así como tampoco cuando las ratas destetadas se alimentan con una dieta al 1% en colesterol.

Slakey y col (254), estudiando el efecto del ayuno y la realimentación sobre la mevalonato cinasa, observaron que ninguna de estas condiciones afectan a la actividad de la enzima. Tampoco lograron detectar la existencia de un ritmo diurno en la actividad de la enzima. No parece probable que la inhibición de la mevalonato cinasa por geranil y farnesil pirofosfato (256) pueda influir en el flujo de materiales a través de la ruta de biosíntesis de colesterol durante el ayuno y realimentación puesto que la síntesis de farnesil pirofosfato aumenta durante la realimentación y la recuperación observada en la conversión de MVA a escualeno tras la realimentación en tan rápida como la recuperación de la actividad dimetil alil transferasa disminuida por el ayuno (254).

Recientemente (197) se ha demostrado que la mevalonato cinasa puede ser modulada por LDL, ya que en células ováricas de hamster en cultivo la eliminación de lípidos del medio de cultivo produce un aumento significativo en la actividad mevalonato cinasa, aumento que es prevenido por adición de 25-hidroxicolesterol o LDL al medio de cultivo.

1. C. 3. - FOSFOMEVALONATO CINASA

Henning y col (262) pusieron de manifiesto en autolisados de levadura la formación de PPMVA a partir de MVA en presencia de la fosfomevalonato cinasa. Mediante purificación parcial de la enzima demostraron que la reacción catalizada por ella es reversible en presencia de un exceso de ADP. También se ha mostrado en cerebro de rata que la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa es reversible (257).

En el pollo, no se ha logrado detectar variaciones apreciables en la actividad de la fosfomevalonato cinasa ni en hígado (260) ni en cerebro o riñón (259) a lo largo del desarrollo postnatal. Tampoco en cerebro de rata (257) se han observado variaciones apreciables en la actividad de la enzima desde el nacimiento hasta los 52 días de edad.

En hígado, por el contrario (261) se ha observado un aumento de un 50% en la actividad de la fosfomevalonato cinasa tras el destete. Esto podría sugerir que esta enzima podría ser una etapa limitante, pero puesto que la reacción catalizada por la fosfomevalonato cinasa es reversible, el nivel de PPMVA formado o acumulado es regulado por el equilibrio constante de la reacción de la cinasa, particularmente cuando la tasa de descarboxilación es baja. Por ello los niveles reducidos de PPMVA formado no reflejan necesariamente menor actividad en la fosfomevalonato cinasa.

Al igual que la mevalonato cinasa, la fosfomevalonato cinasa (254) se ha mostrado independiente de condiciones tales como el ayuno y realimentación. Asimismo, tampoco se ha observado la existencia de un ritmo diurno en esta enzima.

Shama Baht y Ramasarma (263) han mostrado una inhibición en la actividad de esta enzima producida por algunos compuestos fenólicos y fenílicos. Así, el ácido p-cumárico, ácido cinámico y ácido isoferúlico produce una inhibición de un 71% en la fosfomevalonato cinasa.

1. C. 4.- PIROFOSFOMEVALONATO DESCARBOXILASA

Henning y col (262) en 1959 detectaron actividad descarboxilasa en extractos de levadura a partir de 1-¹⁴C-MVA obtenido por síntesis enzimática y usado como sustrato. Para la actividad de la enzima se requería ATP. También se ha observado su dependencia respecto al ATP en cerebro de rata (257) y de pollo (258) así como un pH próximo a la neutralidad para su actividad óptima.

En preparaciones de hígado de animales alimentados con una dieta rica en colesterol se ha demostrado una parcial inhibición en la conversión de MVA a colesterol, aunque esta inhibición era menor que la observada desde acetato. Gould y Swiryd (142) mediante técnicas "in vivo" e "in vitro" detectan, en ambos casos, una inhibición en la conversión de MVA a colesterol en hígado de rata. La síntesis disminuye un 30% tras una semana de alimentación con colesterol; al año la inhibición fue casi completa. Estos autores observaron igualmente una disminución en la tasa de incorporación de MVA a farnesil pirofosfato, así como en la de farnesil pirofosfato a escualeno e indicaron por ello la existencia de lugares secundarios de control de la colesterogénesis hepática localizados

entre MVA y farnesil pirofosfato, y tras éste, probablemente en su conversión a escualeno. Puesto que las capacidades máximas de homogenados normales de hígado para sintetizar colesterol desde MVA fue mayor que desde acetato, se ha sugerido (142) que los lugares de inhibición localizados tras acetato no tienen probablemente un efecto muy significativo en la tasa de síntesis de colesterol en el animal intacto alimentado con colesterol.

Ramachandran y Shah (257) han observado en cerebro de rata un patrón de desarrollo en la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa a diferencia de los enzimas implicados en la fosforilación del MVA. Así, la actividad aumenta durante los tres días posteriores al nacimiento, alcanzando un pico de máxima actividad sobre el 8º día de edad para disminuir lentamente más tarde. Este patrón de desarrollo es semejante al observado para la actividad HMG-CoA reductasa (215), desmosterol reductasa (97) y a la tasa de acumulación de colesterol en cerebro (97). Por ello parece ser que la actividad de la pirofosfomevalonato descarboxilasa cambia en coordinación con otras enzimas que sintetizan colesterol. Puesto que las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa no disminuyen en el cerebro del animal adulto, es razonable sugerir que la descarboxilación del PPMVA juega un papel regulador en la síntesis cerebral de esteroides.

En cerebro de pollo durante el periodo postnatal González-Pacanowska y col (264) no han hallado cambios apreciables en la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa, aunque los niveles de actividad son elevados, pero se ha de tener en cuenta que en el pollo durante el período estudiado (3-17 días) la mielinización ha finalizado casi totalmente y por lo tanto no se requiere una biosíntesis muy activa de colesterol.

En este mismo estudio, el hígado ha mostrado un comportamiento completamente distinto al observado en cerebro ya que la actividad aumenta de forma patente llegando a alcanzar niveles superiores a los observados en cerebro. En asa duodenal y riñón la pirofosfomevalonato descarboxilasa presenta actividades mucho menores sin cambios significativos en relación con la edad.

Ramachandran y Shah (261), estudiando la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa en hígado de ratas lactantes y destetadas han observado que la actividad es mucho menor en ratas lactantes y la relación MVAPP/CO₂ es muy superior en este caso. El aumento observado en la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa hepática con el destete es parcialmente prevenido por alimentación con dieta al 1% en colesterol. Estos hechos junto con observaciones iniciales (156) de que el aumento tras el destete en la conversión de MVA a escualeno es parcialmente prevenido por alimentación con colesterol a los animales destetados indican por tanto que la descarboxilación del PPMVA en hígado es una etapa reguladora (261) al igual que en cerebro (257). La baja actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa observada en animales lactantes se ha asociado con la inhibición producida por el colesterol de la leche materna.

Ranganathan y Ramasarma observaron en 1973 (265) una inhibición en la incorporación de MVA a colesterol producida por compuestos fenólicos y fenílicos al ser añadidos "in vitro". El hidroxicianamato (metabolito de la tirosina) fue el inhibidor más potente. Drogas hipocolesterolémicas que se conoce que afectan a alguna etapa anterior a la formación de MVA "in vivo" producen también inhibición "in vitro" en una etapa posterior a la formación de MVA. Para este efecto parece ser necesaria la presencia de un anillo aromático y un grupo carboxílico. Más tarde (263) se ha observado inhibición en la

actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa producida por compuestos fenólicos y fenílicos. Esta inhibición es de dos tipos, competitiva y no competitiva. Los compuestos que presentan una inhibición competitiva probablemente tienen semejanzas estructurales con el MVA fosforilado en solución. Las que presentan inhibición no competitiva deben afectar a la actividad por otro mecanismo.

Durr (266) ha observado una inhibición en la incorporación de MVA a lípidos insaponificables en intestino delgado e hígado de rata, producida por el ayuno. Slakey y col (254) estudiando el efecto del ayuno sobre las enzimas implicadas en la conversión de HMG-CoA a escualeno detectaron que todas las actividades medidas -HMG-CoA reductasa, pirofosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, dimetil alil transferasa y escualeno sintetasa-, declinan rápidamente en ayuno y vuelven a los niveles normales tras la realimentación. La variación observada en la HMG-CoA reductasa es suficiente para ser responsable de las variaciones apreciadas en la incorporación de acetato a colesterol por homogenados de hígado. Pero sin embargo los cambios en la tasa de conversión de MVA a colesterol y la conducta de las enzimas intermediarias indican que al menos existen dos procesos reguladores que controlan el flujo de material a través de esta ruta.

Shama Bhat y Ramasarma (267) han mostrado la existencia de un ritmo circadiano "in vivo" en la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa en hígado de rata observándose un patrón de actividad semejante en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA "in vitro" así como en la recogida de CO₂ procedente de 1-¹⁴C-MVA. Por lo tanto la actividad rítmica debe estar localizada entre MVA e isopentenil pirofosfato y posiblemente a nivel

de la pirofosfomevalonato descarboxilasa. De hecho Shama Bhat y Ramasarma (263) detectan un aumento en su actividad durante un período de 12 horas en hígado de rata. Estos resultados sin embargo no estan de acuerdo con las publicaciones previas de Slakey y col (254) que realizaron medidas directas de todas las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol entre MVA y escualeno y no encontraron variación diurna en ninguna de ellas. Tampoco Jabalquinto y Cardemil (268) detectan variación a lo largo del día en la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa en hígado o riñón de rata. Estos mismos autores observan una disminución en la actividad por alimentación de colesterol y un aumento por tratamiento con colestiramina en hígado pero no en riñón. Esto podría indicar que el lugar secundario de control de la biosíntesis de colesterol en riñón es probablemente distinto al del hígado.

de los trabajos desarrollados en nuestro Departamento el siguiente plan de trabajo:

1.- Estudio de la evolución en el contenido de colesterol total, libre y esterificado en hígado y riñón de pollo a lo largo del desarrollo embrionario.

2.- Estudio de la variación en las actividades enzimáticas implicadas en la fosforilación y carboxilación del MVA en cerebro, hígado y riñón de pollo a lo largo del desarrollo embrionario.

3.- Estudio de la evolución en la velocidad de oxidación de $2-^{14}\text{C-MVA}$ a $^{14}\text{CO}_2$ y lípidos esterificables, por los cuatro órganos antes citados, durante el desarrollo del pollo.

4.- Estudio de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa por los cuatro órganos citados a lo largo del desarrollo embrionario.

5.- Estudio de la concentración de lípidos en el cerebro.

II.- PLAN DE TRABAJO

desarrollado por el autor en colaboración con el Dr. J. M. S. en el Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Universidad de Granada, durante el curso 1971-72, en el grado de Trabajo de Investigación en colaboración con la HMG-CoA reductasa.

5.- Estudio de la actividad de la HMG-CoA reductasa en hígado y riñón de pollo a lo largo del desarrollo embrionario.



... (265) detectan un aumento en la actividad durante el día de 12 horas en hígado de rata. Estos resultados son de acuerdo con las publicaciones previas de ... (214) que realizaron medidas directas de todas las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol entre MVA y escualo y no encuentran variación diurna en ninguna de ellas. ... (265) detectan variación en la actividad de la enzima pirroloquinolimonato descarboxilasa en el hígado de rata. Estas mismas autoras observan una disminución en la actividad por alimentación de colesterol y esto por tratamiento con colesterol en hígado pero no en el resto del cuerpo. Esto podría indicar que el lugar secundario de control de la biosíntesis de colesterol en hígado es probablemente el hígado.

II.- PLAN DE TRABAJO

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

- 1.- Estudio de la evolución en el contenido en colesterol total, libre y esterificado en cerebro, hígado y riñón de pollo a lo largo del desarrollo embrionario.
- 2.- Estudio de la variación en las actividades enzimáticas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del MVA en cerebro, hígado, intestino y riñón de pollo a lo largo del desarrollo embrionario.
- 3.- Estudio de la evolución en la velocidad de utilización de 2-¹⁴C-MVA a ¹⁴CO₂ y lípidos insaponificables, por los cuatro órganos anteriormente citados, durante el desarrollo perinatal del pollo.
- 4.- Estudio de la evolución en la actividad HMG-CoA reductasa por los mismos órganos a lo largo del desarrollo perinatal.
- 5.- Estudio de la composición lipídica de microsomas de cerebro e hígado de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. Cálculo de la relación molar colesterol/ fosfolípidos como índice del grado de fluidez de las membranas y su relación con la HMG-CoA reductasa.
- 6.- Estudio de la incorporación de 1-¹⁴C-acetato a lípidos insaponificables por el cerebro e hígado de pollo a lo largo del desarrollo perinatal.

3. A. 1. - MATERIAL BIOLÓGICO

Los estudios se efectuaron sobre embriones de sexos procedentes de huevos de gallinas (Gallus de raza leghorn blanca suministrados por Avigrans S.

Las distintas experiencias se ha realizadas con edades comprendidas entre los 10 y 21 días de desarrollo embrionario, aunque en algunos casos se usaron pollos cuyas edades oscilaron entre 0 y 5 días de vida.

3. A. 2. - CONDICIONES DE INCUBACION

La incubación se llevó a cabo a una temperatura constante de 37.8 ± 0.5 °C. tras disponer los huevos en un extremo más estrecho hacia abajo y formando un ángulo con la vertical, para evitar malposiciones del embrión del huevo.

Durante los primeros 14 días de desarrollo embrionario, los huevos se voltearon de forma periódica.

La humedad relativa dentro de la cámara de incubación se mantuvo en un 60% desde el día 14 hasta el día 21 de desarrollo embrionario hasta la eclosión.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

3. A. 3. - APARATOS

La incubación se realizó en un incubador automático de tipo 11K y 2S suministrados por Marconi S.p.A. para 90 y 180 huevos respectivamente. El control de temperatura y humedad es automático.

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

III. - PARTE EXPERIM

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

3. A. - MATERIAL

3. A. 1. - MATERIAL BIOLÓGICO

Los estudios se efectuaron sobre embriones de ambos sexos procedentes de huevos de gallinas (Gallus domesticus) de raza Leghorn blanca suministrados por Avigrana S. A.

Las distintas experiencias se ha realizado en animales con edades comprendidas entre los 10 y 21 días de desarrollo embrionario, aunque en algunos casos se usaron también pollos cuyas edades oscilaron entre 0 y 5 días de vida postnatal.

3. A. 2. - CONDICIONES DE INCUBACION

La incubación se llevó a cabo a una temperatura constante de 37.8 ± 0.5 °C tras disponer los huevos con el extremo más estrecho hacia abajo y formando un ángulo de 30° con la vertical, para evitar malposiciones del embrión dentro del huevo.

Durante los primeros 18 días de desarrollo embrionario, los huevos se voltearon de forma periódica cada hora.

La humedad relativa dentro de la incubadora se fijó en un 60% desde el día 14 de incubación hasta el momento de la eclosión.

3. A. 3. - APARATOS

La incubación se realizó en incubadoras modelo 11R y 25 suministradas por Masallés (Barcelona) con capacidad para 90 y 180 huevos respectivamente, y provistas de volteo automático.

Las pesadas de material biológico y de reactivos se realizaron en una balanza Sartorius (Pmax.= 160g., d=0.1g.) Para pesadas más exactas se uso una balanza Mettler H 20T(Pmax= 160g. d=0.01 mg).

La colocación de las muestras en placas de cromatografía así como la adición de sustratos y coenzimas a los tubos de reacción se realizó mediante micropipetas "Emil Works" de enrasado automático por estrangulamiento (autocero High precisión). En otros casos donde se requería menor precisión se usaron micropipetas automáticas tipo Finnpiquette (Finland).

Los tejidos (a menos que se indique lo contrario) se homogenizaron en un "Potter" mecánico (MSE) con pistilo de vidrio sin esmerilar.

Para la agitación de los tubos se emplearon vibradores Whirlimixer y Heidolph, así como agitadores S/Invester.

El pH se determinó mediante un aparato Beckman Expandomatic SS-2 (pH \pm 0.005).

Para las centrifugaciones realizadas a bajas revoluciones se usó una centrífuga refrigerada MSE modelo Mistral-6L. Cuando no se requería control de temperatura, las centrifugaciones a bajas velocidades se realizaron en centrífugas Piccolo (Martin Christ).

Para la preparación de suspensiones microsomales se utilizó una centrífuga refrigerada de alta velocidad Beckman J-21B.

Las centrifugaciones realizadas a altas revoluciones (105.000 x g) se llevaron a cabo en una ultracentrífuga preparativa Beckman L3-50.

Tras la reacción enzimática, y para volúmenes inferiores a 0.5 ml, la precipitación de proteínas se realizó en una microfuga Beckman, tipo B.

Las determinaciones colorimétricas se hicieron en un fotocolorímetro Bausch-Lomb modelo Spectronic-20.

Las determinaciones isotópicas de ^{14}C y ^3H se llevaron a cabo en un equipo de centelleo líquido Philips modelo PW5410.

Para la identificación de zonas radiactivas se usó el sistema Actigraph III mod. 1002 (Nuclear Chicago).

Las incubaciones tanto durante la reacción enzimática, como para la determinación de colesterol se realizaron en baños termostatzados mediante "fuera bordas" Tecam Tempunit (precisión = $\pm 0.1^\circ\text{C}$).

Las incorporaciones de acetato y de mevalonato se llevaron a cabo en incubadores metabólicos Gallenkamp IH - 350, provistos de un sistema de agitación.

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

Los lípidos insaponificables disueltos en éter de petróleo se llevaron a sequedad en un rotavapor "R" de la firma Büchi (Suiza).

Todos los gases utilizados fueron suministrados por Oximesa S.A.

Los datos experimentales se procesaron en un microordenador EAKA video Genie system EG-3003.

3. A. 4. - REACTIVOS

Todos los compuestos radiactivos usados fueron suministrados por Radiochemical Centre (Amersham).

El resto de los productos utilizados (mientras no se especifique lo contrario) proceden de la casa Merck (Darmstadt) y Carlo Erba (Milan).

3. B. - METODOS

3. B. 1. - DETERMINACION DE COLESTEROL

3. B. 1. 1. - Extracción de lípidos

Una vez aislado el embrión de las cubiertas extraembrionarias, se sacrificó por decapitación y se procedió a la obtención del órgano correspondiente que se dispuso en solución salina.

Los lípidos fueron extraídos siguiendo el método de Santiago y col (269).

Se depositó el órgano a estudiar, previamente triturado, en un Potter manual junto con 2 ml de mezcla cloroformo: metanol: clorhídrico (200: 100:1) y se homogenizó durante 5 min. El homogenado resultante se vertió a un tubo de boca esmerilada al que se añadió 3 ml de ClH 0.1N y se agitó fuertemente durante 1 min.

Tras una centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 min aparecían 3 fases:

La fase superior (acuosa) se eliminó mediante una pipeta Pasteur adaptada a una perilla de goma.

La fase clorofórmica inferior se recogió en otro tubo mediante una cuidadosa decantación.

Con la fase intermedia proteica se realizó una segunda extracción siguiendo exactamente el mismo método. La fase orgánica resultante de esta segunda extracción se reunió con la primera y se evaporó posteriormente bajo corriente de nitrógeno.

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

3. B. 1. 2. - Determinación de colesterol total

Para la determinación de colesterol total se siguió la técnica de Carr (270) y Martenson (271).

Se trata de una técnica colorimétrica basada en la reacción de Lieberman - Burchard en la que el colesterol sufre una deshidratación, condensación e isomerización en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico dando lugar a la aparición de compuestos coloreados con un máximo de absorción a 620 nm.

3. B. 1. 2. 1. - Técnica

Del extracto lipídico correspondiente se tomaron dos alícuotas de 25 y 50 μ l, llevándose a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Asimismo de una solución patrón de colesterol que contenía 1 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo, se tomaron 25, 50, 75 y 100 μ l llevando igualmente a sequedad.

Una vez secos los tubos problemas y los patrones, se les agregó 100 μ l de cloroformo disolviendo perfectamente el extracto lipídico mediante una agitación suave. A continuación se añadió a cada tubo 3 ml de una mezcla de anhídrido acético: ácido sulfúrico (10:1) preparado extemporáneamente, en frío (es necesario que la mezcla sea totalmente transparente).

Tras agitar los tubos se dispusieron en un baño de agua a 25°C durante 10 minutos al cabo de los cuales se leyeron en espectrofotómetro a 620 nm.

3. B. 1. 3. - Determinación de colesterol libre y esterificado

La separación del colesterol libre de su éster se realizó por cromatografía en capa fina siguiendo la técnica de Corominas (272).

3. B. 1. 3. 1. - Preparación de las placas

En un extensor Shandan Unoplan se dispusieron placas de vidrio de 20 x 20 cm previamente desengrasadas con acetona.

En un erlenmeyer de 250 ml se dispusieron 50 gr. de silicagel G (tipo 60) y 100 ml de agua destilada agitándose vigorosamente durante 1.5 min. Inmediatamente se vertió esta suspensión sobre un extensor adaptado para obtener un espesor de capa de 0.4 mm, extendiéndose el silicagel de manera uniforme por toda la superficie de la placa.

Tras secarse completamente a temperatura ambiente se dispusieron las placas en una gradilla y se activaron en estufa a 120°C durante dos horas como mínimo.

3. B. 1. 3. 2. - Desarrollo y revelado de las placas

Una alícuota de 100 ó 200 μ l (dependiendo de la riqueza lipídica de la muestra) se dispuso a 2 cm del borde inferior de la placa ya activada.

El desarrollo de la placa se llevó a cabo en cubetas de vidrio donde se dispuso como líquido de desarrollo 100 ml de la mezcla cloroformo: benceno (60:40). El solvente se mantuvo al menos seis horas en la cubeta de cromatografía para conseguir una perfecta saturación. Una vez alcanzado un

frente de 15 cm, se retiran las placas, secándolas con secador antes de proceder a su revelado.

El revelado se realizó mediante vapores de yodo. El yodo se sublima fijándose a los dobles enlaces apareciendo manchas de color amarillento. Tras marcar las manchas aparecidas con ayuda de un punzón se eliminó el yodo a alta temperatura.

De esta forma se separan los siguientes compuestos con el Rf indicado.

	<u>Rf</u>	
Esteres de colesterol	0.7	
Triglicéridos	0.53	
Colesterol libre	0.15	
Ácidos grasos	0.05	
Fosfolípidos	0.00	

3. B. 1. 3. 3. - Técnica

Las zonas correspondientes a colesterol libre y esterificado se rasparon y depositaron en tubos de centrifuga. A cada uno de ellos se añadió 3 ml de la mezcla etanol: acetona: éter etílico (1: 1: 1). Se agitó durante quince segundos y se centrifugó posteriormente durante 15 min a 1000 x g.

El sobrenadante se decantó a otro tubo y con el precipitado se realizó una segunda extracción de igual forma. Los sobrenadantes se reunieron y se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno siguiendo el método para la determinación de colesterol ya descrito (apartado 3. B. 1. 2. 1.)

3. B. 1. 3. 4. Cálculos

Con los datos obtenidos de esta forma se calculan los porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado. Aplicando estos porcentajes al contenido en colesterol total, hallado anteriormente, se calcula el contenido en colesterol libre y esterificado - expresado como miligramos en el órgano completo y en miligramos por 100 miligramos de tejido fresco-.

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

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

Siendo:

T= contenido en colesterol total

SEM_T = error estándar de la media del contenido en colesterol total

P = fracción de colesterol libre o esterificado

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

3. B. 2. - ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MEVALONATO CINASA, FOSFOMEVALONATO CINASA Y PIROFOSFOMEVALONATO DESCARBOXILASA

3. B. 2. 1. - Obtención de las preparaciones enzimáticas

Puesto que las tres enzimas objeto de este estudio son citoplasmáticas, un primer paso en la determinación de la actividad enzimática fue la obtención del sobrenadante resultado de la centrifugación a 105.000 x g que fue usado como preparación enzimática.

Una vez extraído el órgano correspondiente se colocó en solución salina al 0.9% a 4°C. Este se homogenizó (mediante un "potter" mecánico) con tampón fosfato potásico 0.1 M pH = 7.4 que contenía además como protectores EDTA 1 mM, Cl_2Mg 4 mM y β -ME 10 mM en una proporción órgano/tampón 1:8 (p/v). Durante todos los pasos del proceso el recipiente que contenía la muestra se mantuvo en un baño agua-hielo con objeto de evitar en lo posible modificaciones de la temperatura que pudieran afectar a la actividad de las enzimas. El homogenado se sometió a una centrifugación de 105.000 x g durante 60 minutos, de la que se recogió el sobrenadante y se reservó a 4°C hasta el momento de realizar la reacción enzimática.

La concentración proteica de este sobrenadante se determinó según el método de Lowry y col (273) basado en la asociación de las reacciones de Biuret y Folin y usando como patrón una solución de albúmina bovina (0.5 mg/ml) (Fracción V, Powder, Armour Pharmaceutical Co).

3. B. 2. 2. - Determinación de las actividades enzimáticas

Se ha utilizado el método radiactivo desarrollado por Ramachandran y Shah (261).

En esta técnica se mide la incorporación de radiactividad desde el sustrato marcado con ^{14}C al producto de la reacción que es resultado de la actuación de cada enzima. Se mide en este caso, por tanto, la incorporación de radiactividad desde $1\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ a PMVA, PPMVA y CO_2 desprendido para determinar la actividad mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa, respectivamente.

3. B. 2. 2. 1. - Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas para la determinación de PMVA y PPMVA se han realizado mediante incubación del extracto enzimático a 37°C durante 30 min. en presencia de tampón fosfato potásico a 0.1 M pH=7.4, Cl_2 Mg (5.5 μ mol), ATP (3.5 μ mol) y $1^{14}C$ -MVA en forma de sal potásica (0.273 μ mol, 277.5×10^3 d.p.m.) en un volumen final de 1 ml.

La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en agua a 90°C durante 5 minutos. Las proteínas existentes en el medio de reacción se sedimentaron por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 5 min. a temperatura ambiente.

La reacción enzimática para la determinación del CO_2 desprendido como consecuencia de la descarboxilación del PPMVA, se llevó a cabo en matraces cónicos provistos de un pocillo central en el que se dispuso 0.4 ml de NaOH (Sigma) al 12%. El medio de reacción antes mencionado se dispuso en el compartimento principal, cerrándose los matraces herméticamente. La incubación se realizó durante 30 min a 37°C, sometiendo durante este tiempo a los matracillos a una agitación de 70 oscilaciones por minuto.

La reacción se detuvo por inyección en el compartimento principal de 0.5ml de ácido sulfúrico 5 N. Los matraces fueron agitados durante 60 minutos más, con objeto de que todo el CO_2 desprendido tras la acidificación del medio fuese recogido por el NaOH del pocillo central. En todos los casos los extractos enzimáticos fueron diluidos apropiadamente con tampón fosfato potásico 0.1 M pH = 7.4, para conseguir una concentración de proteínas comprendida entre 0.2 - 0.3 mg/ml que nos permitiera trabajar en la zona exponencial de la curva proteínas/actividad.

3. B. 2. 2. 2. - Aislamiento y medida de los productos de reacción

El PMVA y PPMVA formados, se separaron, mediante cromatografía ascendente en papel, a partir de una alícuota de cada uno de los sobrenadantes. Se usó papel Whatman nº 1 preparando tiras de 3.5 cm de ancho y 28.5 cm. de largo y la muestra se aplicó a 3 cm del borde inferior, longitudinalmente y con una extensión no superior a 2.5 cm, usando para el secado una corriente de aire caliente.

El desarrollo se realizó en campanas de vidrio cerradas herméticamente y dejadas saturar previamente durante 6 horas como mínimo. El líquido de desarrollo empleado fue: butanol : ácido fórmico : agua (77:10:13). Los cromatogramas se dejaron desarrollar durante 12 horas transcurridas las cuales se retiraron de la cubeta de cromatografía y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La identificación de las zonas correspondientes a cada una de las fracciones formadas, PMVA y PPMVA, se realizó mediante un sistema Actigraph III, provisto de dos detectores Geiger entre los cuales se hacían pasar los cromatogramas.

La zona radiactiva de cada fracción se recortó del papel y se dispuso en viales de centelleo a los que se añadió 10 ml de líquido de centelleo compuesto por:

- 5 gr. PPO
- 0.3 gr. POPOP
- 1 l. Tolueno

La medida del CO_2 desprendido en la descárbxilación del PPMVA se realizó tomando dos alícuotas del contenido del pocillo central inmediatamente después de finalizada la reincubación. Estas se dispusieron en sendos viales de centelleo.

El líquido de centelleo usado (10 ml/vial) en este caso ha sido:

- 2 gr PPO
- 0.02 gr POPOP
- 0.5 l. Tolueno
- 0.5 l. Metanol

En todos los casos el contenido en ^{14}C de los viales se determinó mediante un contador de centelleo líquido que nos da las d.p.m. producidas por el ^{14}C contenido en vial.

Como factor de corrección se empleó un estándar externo de $1\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ de d.p.m. teóricas conocidas.

3. B. 2. 2. 3. - Cálculos

La actividad enzimática específica se calculó en cada caso según la siguiente expresión:

$$A_e = \frac{\text{d.p.m.}_m \times \text{d.p.m.}_t}{\text{d.p.m.}_e \times V_m \times R_e \times P} \text{ nmoles. mg prot.}^{-1} \text{ 30 min.}^{-1}$$

siendo:

A_e = actividad de la enzima.

d.p.m._m = desintegraciones por minuto del ^{14}C contenido en la muestra.

d.p.m._t = desintegraciones por minuto del estándar externo de $1\text{-}^{14}\text{C-MVA}$.

d.p.m._e = desintegraciones por minuto del estándar de $1\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ obtenidos en el contador de centelleo.

V_m = volumen de la muestra llevada a vial

R_e = d.p.m./n mol del $1\text{-}^{14}\text{C MVA}$ usado como sustrato de la reacción.

P = mg de proteínas puestos en el medio de reacción.

La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa se obtiene a partir de la cantidad de CO_2 desprendido como resultado de la reacción catalizada por dicho enzima. La actividad fosfomevalonato cinasa representa la suma de los nmoles de PPMVA y CO_2 obtenidos. La actividad mevalonato cinasa se obtiene a partir de la suma de los nmoles de PMVA, PPMVA y CO_2 observados.

3. B. 3. - INCORPORACION DE MVA POR LA RUTA DE ESTEROLES Y NO ESTEROLES

El método utilizado está basado en el descrito por Righetti y col (181).

En esta técnica se trata de medir la velocidad de incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C}$ MVA (incubado en presencia de distintos tejidos) a lípidos insaponificables, constituidos fundamentalmente por colesterol y otros productos isoprenoides, así como a CO_2 desprendido como resultado del "shunt" del MVA si éste existe en los tejidos embrionarios.

3. B. 3. 1. - Procedimientos de incubación

Tras la separación de las cubiertas extraembrionarias, se sacrificaron los embriones por decapitación, procediéndose a la extracción del órgano correspondiente, que se dispuso inmediatamente en un medio tamponado frío.

El tampón usado es un medio de Krebs-Ringer bicarbonato $\text{pH}=7.4$. Para su preparación se mezclaron las siguientes soluciones:

- 120 ml de ClNa 18%
- 96 ml de ClK 1.15%

- 18.5 ml de $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$ 0.2 M
- 24 ml de $\text{SO}_4 \text{Mg} 7\text{H}_2\text{O}$ 3.82%
- 72 ml de $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ 0.11 M
- 72 ml de $\text{CO}_3 \text{HNa}$ 1.3 %
- 2280 ml de agua destilada

Para la incubación se usaron matraces cónicos con capacidad de 25 ml provistos de un pocillo central. Los órganos se incubaron íntegros siempre que su peso no excediera los 200 mg, en cuyo caso se dividieron en partes iguales y se incubaron por separado.

Los distintos órganos se colocaron en el compartimento principal del matracillo junto con 1.9 ml de tampón Krebs-bicarbonato frío (pH=7.4) y 0.1 ml de la solución de $1\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ en forma de sal potásica equivalente a $1.12 \mu\text{Ci}$ (400 nmoles).

Los matraces se gasearon con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) cerrándose herméticamente, tras lo cual se dispusieron en un incubador metabólico termostatzado a 37°C y provisto de un movimiento de vaivén ajustado a 100 oscilaciones por minuto.

Tras 120 minutos se detuvo la reacción por adición de 0.5 ml de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 2N en el compartimento principal, así como 0.4 ml de Na OH 12% en el pocillo central con objeto de recoger el CO_2 disuelto en el medio desprendido por la acidificación de este.

Para procurar la recogida total del CO_2 por el NaOH del pocillo central se reincubaron los matracillos durante 45 minutos a 70 oscilaciones por minuto.

3. B. 3. 2. - Detección y medida de $^{14}\text{CO}_2$

Inmediatamente después de la reincubación se abrieron los matraces, y tomándose dos alícuotas del contenido del pocillo central se llevaron a sendos viales de centelleo en los que se había dispuesto previamente 10 ml del siguiente líquido de centelleo:

- 2 gr PPO
- 0.02 gr POPOP
- 0.5 l Metanol
- 0.5 l Tolueno

las d.p.m. obtenidas de la medida de las distintas muestras en un contador de centelleo líquido se usaron para determinar la velocidad de incorporación del sustrato marcado a CO_2 .

3. B. 3. 2. 1. - Cálculos

La velocidad de incorporación del sustrato a CO_2 se calculó por la expresión:

$$Ae = \frac{\text{d.p.m.}_m \times Vp}{G \times T \times Vm \times Re} \quad \text{nmoles} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$$

donde:

Ae = actividad específica de la producción de CO_2

d.p.m._m = desintegraciones por minuto obtenidas de la medida del ^{14}C contenido en la muestra

Vp = volumen del pocillo central en ml

G = gramos de tejido usado para la incubación

T = tiempo de reacción en horas

Vm = volumen de la alícuota usada para la medida

Re = radiactividad específica del sustrato en d.p.m./nmol.

3. B. 3. 3. - Lípidos insaponificables

3. B. 3. 3. 1. - Extracción

Como estándar interno y con objeto de conocer el rendimiento de la extracción y medida de los lípidos insaponificables se añadió al compartimiento central del matraz una cantidad conocida de ^3H -colesterol para poder corregir el defecto cometido en las posibles pérdidas de las extracciones posteriores.

El contenido del matraz (fuera del pocillo central) se transfirió mediante una pipeta Pasteur, adaptada a una perilla de goma, a un matraz Erlenmeyer al que se adicionó 15 ml de etanol al 70% y 1 ml de una solución de KOH al 90% con objeto de producir la saponificación. Tras 12 horas como mínimo se realizó la extracción de los lípidos no saponificados.

El contenido del matraz se vertió a un embudo de decantación al que se añadió 20 ml de agua destilada y 25 ml de éter de petróleo (Panreac). Después de una vigorosa agitación se recogió la fase orgánica que contenía los lípidos insaponificables. Con la fase acuosa se realizaron dos extracciones más con 25 ml de éter de petróleo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron dos veces con 20 ml de agua destilada.

Como desecante se usó Na_2SO_4 anhidro (Panreac) añadiendo 15 g a las fases orgánicas resultantes de todo el proceso anterior. Tras un mínimo de 30 minutos se eliminó el Na_2SO_4 por filtración a través de un embudo de placa porosa, recogiendo la fase orgánica en un matraz de fondo redondo.

El éter de petróleo se evaporó mediante rotavapor quedando los lípidos insaponificables en el matraz de fondo re-

dondo. Estos, mediante lavados repetidos del matraz con éter etílico (D´Hemio) se recogieron en un vial evaporándose el contenido sobre una superficie a 40°C.

3. B. 3. 3. 2. - Medida de los lípidos insaponificables totales. Cálculos

Tras disolver el contenido del vial en 1 ml de cloroformo se tomaron dos alícuotas de 0.1 ml y se depositaron en viales de centelleo, llevando el resto a sequedad sobre una superficie a 60°C. El contenido de los nuevos viales se evaporó del mismo modo, añadiéndoseles posteriormente 10 ml de líquido de centelleo compuesto por:

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

La medida del ^{14}C y ^3H contenido en los viales se llevó a cabo mediante espectroscopía de centelleo líquido.

Además de los viales problema se midieron en cada experiencia dos viales con la misma cantidad de ^3H que el añadido a las muestras y que constituye el patrón de tritio.

Cálculos

La velocidad de incorporación de 2- ^{14}C -MVA a lípidos insaponificables se calculó a partir de la siguiente fórmula.

$$A_e = \frac{\text{d.p.m. } ^{14}\text{C} \times \text{d.p.m. } ^3\text{H}_p}{\text{d.p.m. } ^3\text{H}_m \times R_e \times T \times G \times V} \quad \text{nmoles. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

donde:

- Ae = actividad específica de la conversión de $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA a lípidos insaponificables.
d.p.m. ^{14}C = desintegraciones por minuto debidas al ^{14}C contenido en la muestra
dpm $^3\text{H}_\beta$ = desintegraciones por minuto de ^3H contenidas en el vial patrón.
d.p.m. $^3\text{H}_m$ = desintegraciones por minuto de ^3H contenidas en la muestra
Re = radiactividad específica del sustrato en d.p.m./nmol
T = tiempo de incubación en horas
G = peso de tejido usado en gramos
V = volumen de la alícuota usada para la medida en ml.

3. B. 3. 3. 3. - Separación y medida de los distintos lípidos insaponificables

Del resto del extracto lipídico guardado en vial se tomó otra alícuota con objeto de conseguir la separación de los distintos insaponificables; para ello se realizó una cromatografía en capa fina. Puesto que se ha observado que el desmosterol está en niveles elevados durante el desarrollo del cerebro de embrión de pollo (93) nos pareció interesante el determinar la incorporación de radiactividad desde el sustrato ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA) a desmosterol además de a otros lípidos insaponificables, en el caso del cerebro.

Por ello para el resto de los órganos estudiados (hígado, tubo intestinal y riñón) la separación de los distintos lípidos insaponificables se realizó mediante cromatografía en capa fina convencional, usando placas de silica gel prepara-

das del mismo modo que para la separación de colesterol libre y esterificado (apartado 3. B. 1. 3. 1.).

Las muestras problema se desarrollaron junto con patrones apropiados para conseguir la identificación de los distintos compuestos separados. Para el desarrollo se procedió del modo descrito en el apartado 3.B.1.3.2. pero el líquido de desarrollo empleado en este caso fue cloroformo no estabilizado.

Los cromatogramas se desarrollaron durante 30 min. al cabo de los cuales se sacaron las placas de la cubeta de cromatografía y tras secar con aire caliente se introdujeron las placas en una campana saturada con yodo. El Rf en las condiciones antes mencionadas fue el siguiente para los distintos lípidos insaponificables separados:

	<u>Rf</u>
Escualeno	0.85
Ubiquinona	0.69
Lanosterol	0.31
Colesterol	0.21

Muy próximo al origen (Rf = 0.04) se determinó un compuesto no identificado del que se midió la radiactividad exactamente igual que para el resto de los insaponificables.

Las distintas manchas aparecidas, tras ser identificadas y marcadas con ayuda de un punzón se rasparon y dispusieron en viales de centelleo.

En el caso del cerebro, puesto que la separación del par colesterol/desmosterol no es posible con el sistema antes mencionado se realizó cromatografía en capa fina usando placas impregnadas con nitrato de plata que permite la separación

de esteroides que difieren en la presencia, número y posición de los dobles enlaces, debido a diferencias estructurales basadas en los distintos grados de insaturación.

Sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm se extendió sílica gel G impregnado con AgNO_3 al 15%. Estas placas se han de conservar en completa oscuridad para evitar la reducción del AgNO_3 . Una vez secas las placas se colocaron en estufa a 90°C durante 30 minutos.

La muestra se aplicó a 2 cm. del borde inferior. El desarrollo de la placa se realizó, en oscuridad, en cubetas de vidrio previamente saturadas durante 60 minutos, con 100 ml de una mezcla de cloroformo: acetona (95:5). Tras 45 minutos se procedió al revelado pulverizando con una disolución de rodamina 6 G al 0.5% en agua y la visualización de las distintas manchas se efectuó con luz ultravioleta.

En estas condiciones se separaron de arriba a abajo y con el R_f indicado los distintos compuestos:

	<u>R_f</u>
Escualeno	0.82
Lanosterol	0.53
Colesterol	0.34
Desmosterol	0.29
Desconocido	0.03

De la placa se rasparon las manchas y se dispusieron en tubos de centrífuga a los que se añadió 3 ml de éter etílico que eluye los lípidos del sílica gel pero no la rodamina. Tras agitar durante 15 segundos se centrifugaron los tubos a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C .

El sobrenadante se trasvasó, con ayuda de una pipeta Pasteur adaptada a una perilla de goma, a un vial y con el precipitado se realizó una segunda extracción, reuniéndose los sobrenadantes y evaporándose el éter étilico sobre una superficie a 70°C.

En todos los casos se añadió a los viales que contenían la muestra problema 10 ml del mismo líquido de centelleo usado para los lípidos insaponificables totales (apartado 3.B. 3.3.2.) midiendo por centelleo líquido las d.p.m. producidas por el ^{14}C y ^3H en el caso del colesterol y por el ^{14}C para el resto de los lípidos insaponificables separados.

El cálculo de la velocidad de incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C.MVA}$ a cada uno de los lípidos se realizó en forma semejante a la indicada para los lípidos insaponificables totales, (apartado 3. B. 3. 3. 2.) aplicando a todos ellos el mismo factor de recuperación del ^3H -colesterol que para el colesterol obtenido en la misma experiencia. A partir de estos valores se calcularon, asimismo, los porcentajes relativos de los distintos lípidos insaponificables.

3. B. 4. - ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA

3. B. 4. 1. - Aislamiento de microsomas

Puesto que la HMG-CoA reductasa es un enzima ligado a membranas microsomales, el primer paso en la determinación de la actividad enzimática es la obtención de la fracción microsomal del tejido a estudiar. El aislamiento de microsomas se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito por Dugan y col (274).

Una vez sacrificado el embrión se le extrajo rápidamente el cerebro, hígado, intestino y riñón, que fueron colocados en solución salina al 0.9% a 4°C. Una vez pesado se troceó el tejido y se colocó con tampón fosfato potásico 50 mM pH=7.4, que contenía además como protectores EDTA (Sigma) 30 mM $MgCl_2$ 250 mM y DTT (Sigma) 1 mM, en una proporción 1/3 peso de tejido/volumen de tampón.

Posteriormente se homogeneizaron las muestras en un Potter mecánico, teniendo la precaución de no permitir variaciones de temperatura; por ello durante todo el proceso el recipiente conteniendo la muestra se mantuvo en un baño agua-hielo. El homogenado se sometió a una primera centrifugación a 5.000 x g a 4°C durante 15 minutos. Tras desechar el sedimento, el sobrenadante sufrió una segunda centrifugación a 15.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento resultante de esta segunda centrifugación (que contenía mitocondrias y lisosomas) se eliminó y con el sobrenadante se realizó una nueva centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos a 4°C. De esta forma sedimenta la llamada fracción microsomal constituida fundamentalmente por fragmentos de retículo endoplasmático liso y rugoso.

Este sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato potásico con protectores y se mantuvo a 4°C para ser usado posteriormente como suspensión enzimática para la determinación de la actividad.

La concentración proteica de las suspensiones microsomales se determinó mediante el método de Lowry y col (273) usando como patrón albúmina bovina.

3. B. 4. 2. - Determinación de la actividad enzimática

El método seguido para la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa fue el desarrollado por Shapiro y col. (275) con ligeras modificaciones.

Se trata de medir la radiactividad incorporada desde el sustrato marcado ^{14}C -HMG-CoA al producto de la reacción (mevalonato). Se incluyó siempre un estándar interno de ^3H -mevalonato con objeto de corregir las posibles pérdidas durante el aislamiento del producto.

Puesto que para la reacción se requiere un buen aporte de coenzima reducido (2 moléculas de NADPH + H^+ por molécula de sustrato transformado), en esta técnica se ha usado un sistema enzimático, encargado de regenerar los equivalentes de reducción gastados, constituido por glucosa-6-P, glucosa-6-P-deshidrogenasa y NADP $^+$.

La reacción se detiene por adición de ácido clorhídrico que actúa inactivando a la reductasa y convirtiendo el ácido mevalónico en su δ -lactona.

3. B. 4. 2. 1. - Reacción enzimática

El procedimiento seguido para la determinación de la actividad enzimática es el siguiente: 100 μl de la suspensión microsomal (previamente diluida en tampón con protectores para obtener una concentración proteica de 2-4 mg/ml) se añadieron a los tubos de reacción (tubos de polietileno de 0.4 ml de capacidad provistos de tampón) y se preincubaron a 37°C durante 5 minutos.

La reacción se inició por adición de 25 μl de sustrato marcado ^{14}C -HMG-CoA (50 nmoles y 75955 d.p.m.) junto

con 25 μ l de sistema regenerante (4.5 μ moles de glucosa-6-P (Sigma), 0.3 U. I. de glucosa-6-P-deshidrogenasa (Boehringer) y 450 nmoles de NADP⁺ (Boehringer)). Tras cerrar y agitar perfectamente el contenido de los tubos, se incubaron éstos durante 30 minutos a 37°C.

Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción por adición de 25 μ l de ClH 10 N. Se añadieron asimismo en este momento 25 μ l de una solución tamponada de mevalonato y ³H-mevalonolactona (0.78 mg de mevalonolactona y entre 40.000 y 160.000 d.p.m. de ³H-mevalonolactona).

Los tubos, cuyo contenido en este momento era de 200 μ l, se taparon y agitaron de nuevo dejándose 30 minutos a 37°C para lograr la completa lactonización del mevalonato formado durante la reacción.

Por último se centrifugaron todos los tubos durante 1 minuto a 10.000 x g con el fin de sedimentar las proteínas existentes en el medio de reacción y evitar, así, su interferencia durante el desarrollo posterior de la muestra en capa fina.

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

La MVA lactona presenta una polaridad sensiblemente menor que la del sustrato (HMG-CoA) pudiendo ser por ello fácilmente separada de éste y de los productos de su hidrólisis mediante cromatografía en capa fina.

Se usaron placas de vidrio de 5 x 20 cm. La preparación de las placas se realizó según se describe en el apartado 3.B.1.3.1. Sobre las placas activadas y a unos 2 cm del bor-

de inferior se aplicaron 100 μ l de cada una de las mezclas de reacción, secando con calor suave.

Inmediatamente después se desarrollaron en campanas de cromatografía previamente saturadas durante 60 minutos con 100 ml de la mezcla benceno: acetona (1:1). Las placas se dejaron desarrollar durante 40 minutos. En estas condiciones la MVA lactona aparece en la placa en la zona comprendida entre Rf 0.38 y 0.7. Esta zona se raspó sistemáticamente y se dispuso en viales de centelleo a los que se añadió 10 ml del siguiente líquido de centelleo:

7 gr POPOP
0.3 gr dimetil POPOP
100 gr Naftaleno
1 l. Dioxano.

Los viales se agitaron durante 15 segundos, guardándose en oscuridad hasta el momento de la medida de las d.p.m. contenidas en cada uno de ellos mediante un contador de centelleo líquido. En cada experiencia se prepararon junto con los viales problema, 2 viales conteniendo 25 μ l de la solución de ^3H -MVA lactona usada durante la reacción y una cantidad de ^{14}C -MVA con una radiactividad 3-6 veces menor constituyendo estos viales el patrón de tritio.

3. B. 4. 2. 3. - Cálculos

Una vez realizada la medida las d.p.m. obtenidas de ^{14}C y ^3H en cada vial se usaron para el cálculo de la actividad enzimática según la siguiente expresión:

$$Ae = \frac{\text{d.p.m. } ^3\text{Hp} \times \text{d.p.m. } ^{14}\text{Cm}}{\text{d.p.m. } ^3\text{Hm} \times Re \times P \times T} \text{ pmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mgP}^{-1}$$

siendo:

Ae = actividad específica de la HMG-CoA reductasa.
d.p.m. $^3\text{H}_p$ = desintegraciones por minuto de ^3H con-
tenido en el patrón.

d.p.m. $^{14}\text{C}_m$ = desintegraciones por minuto de ^{14}C
contenido en la muestra problema.

Re = radiactividad específica del sustrato
en d.p.m./pmol.

P = mg de proteínas puestas en el tubo de reacción.

T = tiempo de reacción en minutos.

3. B. 5. - INCORPORACION DE ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFI- CABLES

Uno de los precursores más comúnmente empleados para estudiar la ruta biosintética de colesterol es el acetato marcado radiactivamente.

La técnica seguida está basada en el método desarrollado por Righetti y col (181). Supone la utilización de ^{14}C -acetato como precursor para determinar la velocidad de incorporación de este sustrato a los distintos lípidos insaponificables mediante medida de la radiactividad que aparece en éstos tras la incubación de los órganos en un medio tamponado, en matraces que se gasean con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) y se disponen en un incubador metabólico provisto de un movimiento de vaivén.

3. B. 5. 1. - Procedimiento de incubación

Tras la extracción de los distintos órganos, se procedió a su colocación en tampón Krebs-bicarbonato frío pH = 7.4.

Los órganos, al igual que en la incorporación de MVA, se usaron enteros o bien se dividieron en partes iguales y se incubaron por separado, dependiendo del peso.

El tejido, tras ser pesado se colocó en el interior de matracillos de 25 ml de capacidad.

Se añadió al tejido 1.95 ml de tampón Krebs-bicarbonato pH = 7.4 y 50 μ l de una solución de 1-¹⁴C-acetato (43 nmoles y 2.5 μ Ci).

A partir de este punto la técnica es en todo igual a la descrita en el apartado 3.B.3. salvo en lo referente a la recogida y medida del CO₂.

3. B. 6. - DETERMINACION DE COLESTEROL Y FOSFORO LIPIDICO EN MEMBRANAS MICROSOMALES

3. B. 6. 1. - Extracción de lípidos

La extracción de los lípidos se llevó a cabo sobre suspensiones microsomales obtenidas del modo descrito en el apartado 3. B. 4. 1.

Se tomaron dos alícuotas de la suspensión microsomal que contenían una concentración de proteínas de 1-2 mg/ml que fueron tratadas con un volumen de ácido perclórico 0.6N necesario para obtener una concentración final de 0.3 M. Tras agitar, se centrifugaron a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C. Así sedimentan lípidos y proteínas.

Una vez desechado el sobrenadante los lípidos del sedimento fueron extraídos siguiendo el método de Santiago y col (269).

Se añadió al sedimento 1 ml de la mezcla cloroformo: metanol: ácido clorhídrico (200: 100:1) y se agitó mediante varilla de vidrio por espacio de 30 minutos. A continuación se añadieron 3 ml de ácido clorhídrico 0.1 N y tras una breve agitación se centrifugó durante 25 minutos a 1000 x g.

La fase superior acuosa, resultante de la centrifugación se eliminó mediante pipeta Pasteur. La fase lipídica se separó del paquete de proteínas intermedio mediante una cuidadosa decantación a un tubo de boca esmerilada manteniéndose a 0°C desde este momento.

Las proteínas de la interfase sufrieron una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento y la fase orgánica de esta segunda extracción se reunió con la procedente de la primera llevandose a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

La fase lipídica se redisolvió en un volumen adecuado de cloroformo del que se tomaron alícuotas para la determinación de colesterol y fosfolípidos.

3. B. 6. 2. - Determinación de colesterol microsomal

3. B. 6. 2. 1. - Determinación de colesterol total. Cálculos

Para la determinación de colesterol total se partió de dos alícuotas de cada extracto lipídico y se analizaron siguiendo la técnica de Carr (270) y Martenson (271) de forma exactamente igual a la ya indicada en el apartado 3. B. 1. 2. para la determinación de colesterol en los distintos órganos embrionarios.

Cálculos

Una vez realizada la medida de colesterol en espectrofotómetro, el valor de absorbancia obtenido se usó para la estimación de la concentración de colesterol total según:

$$C_t = \frac{DO_t \times Ve}{a \times Vm \times P} \quad \mu\text{g} \text{ colesterol} \times \text{mg proteína}^{-1}$$

donde:

C_t = μg de colesterol por mg de proteínas

DO_t = absorbancia debida al colesterol total

a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en μg^{-1}

Ve = volumen de extracto lipídico en ml

Vm = volumen de la alícuota de extracto lipídico

P = mg de proteínas contenidas en la suspensión microsomal a partir de la que se realizó la extracción de lípidos

3. B. 6. 2. 2. - Determinación de colesterol libre y esterificado. Cálculos

Para la separación de colesterol libre y esterificado se ha seguido la técnica de Corominas y col (272) ya indicada en el apartado 2. B. 1. 3.

Cálculos

Una vez obtenido el valor de absorbancia para el colesterol libre y esterificado se calcularon las concentraciones microsomales de colesterol libre y esterificado, así como sus porcentajes relativos a partir de:

$$C_L = \frac{DO_L \times V_E}{a \times V_m \times P}$$

$$C_E = \frac{DO_E \times V_e}{a \times V_m \times P}$$

$$\%CL = \frac{CL \times 100}{CL + CE}$$

$$\%CE = \frac{CE \times 100}{CL + CE}$$

Siendo:

CL = μg de colesterol libre por mg de proteína microsomal

CE = μg de colesterol esterificado por mg de proteína microsomal

%CL = porcentaje de colesterol libre

%CE = 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 μg^{-1}

Ve = volumen de extracto lipídico en ml

Vm = volumen de la alícuota del extracto lipídico cromatografiada.

P = mg de proteínas contenidas en la suspensión microsomal de la que se realizó la extracción de lípidos

3. B. 6. 3. - Determinación de fosfolípidos microsomaes.

Cálculos

La determinación del fósforo lipídico contenido en las membranas microsomaes de los distintos órganos se realizó siguiendo el método de Fiske y Subbarow modificado por Bartlett (276) que consiste en la determinación fotocolorimétrica a 830 nm del complejo coloreado formado tras la reacción de fosfatos con ácido molíbdico en presencia de ácido 1-amino-

-2-naftol-3-sulfónico.

Para poder extrapolar las concentraciones a partir de las densidades ópticas de la muestra se utilizó una solución patrón de fosfato disódico en agua destilada equivalente a 10 γ /ml de fósforo.

De cada extracto lipídico se tomaron tres alícuotas de 25, 50 y 100 μ l que se dispusieron en tubos graduados de 10 ml lavados con un detergente especial exento de fosfatos. Asimismo para la curva patrón se prepararon tres tubos con 0.15, 0.3 y 0.6 ml respectivamente de la solución patrón de fósforo.

A todos los tubos se añadió 1.2 ml de ácido perclórico al 70% y 2 gotas de una solución de molibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 2M completándose posteriormente hasta 2 ml con agua bidestilada. Tras agitarlos con suavidad se dispusieron en un baño de arena a 130°C tapándose con bolas de cristal.

La digestión se llevó a cabo dejando subir la temperatura hasta 180°C manteniéndose a esta temperatura durante 60 minutos hasta que se observó la desaparición completa de color. Una vez fríos los tubos se añadió 0.4 ml de molibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 2M y 0.4 ml de reactivo de Fiske y Subbarov preparado de la siguiente manera:

2 g de 1-amino-2-naftol-3-sulfónico
120 g de metabisulfito sódico
12 g de sulfito sódico anhidro
1 l. de agua bidestilada

Para la perfecta disolución es preciso calentar 1 minuto al baño maría.

Finalmente se completa hasta 10 ml con agua bidestilada, se agita suavemente y se colocan (tapados con bolas de

vidrio) a baño maría a 100°C durante 15 minutos hasta la completa aparición del color azul.

Una vez fríos los tubos se lee en espectrofotómetro a 830 nm.

Cálculos

Con la densidad óptica obtenida de esta forma se realizaron los cálculos de la concentración de fósforo lipídico según la siguiente expresión.

$$P = \frac{DO_P \times V_E}{a \times V_m \times P}$$

Siendo:

P = concentración de fósforo lipídico total en μgr por mg de proteína microsomal

DO_P = absorbancia debida al fósforo total

a = pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados en μg^{-1}

V_E = volumen de extracto lipídico en ml.

V_m = volumen de la alícuota del extracto lipídico

P = mg de proteínas contenidas en la suspensión microsomal a partir de la que se realizó la extracción de los lípidos

3. B. 6. 4. - Calculo de la relación molar colesterol / fosfolípidos

El cálculo de la relación molar colesterol / fosforo lipídico se realizó según la expresión:

DO Y KINON A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Se ha estudiado la variación en el contenido de colesterol total, libre y esterificado en cerebro, hígado y riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. De partida de nuestro trabajo puesto que las variaciones de estos parámetros pueden servirnos de indicio de los cambios metabólicos que ocurren en el mismo período.

4. A. 1. - VARIACION DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN C

En la tabla I aparecen indicados los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de colesterol libre y esterificado en cerebro embrionario expresados de colesterol en el órgano completo.

Estos valores se han representado en la figura 1 donde se observa claramente el extraordinario aumento que se produce en los niveles de colesterol total, que varían desde valores próximos a 0 mg. hasta unos 100 mg. aproximadamente. El colesterol libre va por los pines y los esterificado sigue de forma muy próxima y paralela a la del total. El colesterol esterificado por el contrario, es prácticamente a lo largo del período estudiado, manteniéndose siempre en niveles inferiores.

IV. - RESULTADOS

Cuando los resultados de colesterol observado en cada 100 mg. de cerebro, se grafica, se aprecia igualmente una marcada asociación de este colesterol que es patente a partir de un momento del desarrollo embrionario, momento a partir del cual se ven los niveles e incluso disminuyen al punto de quedar

$$C/P = \frac{C \times P_{af}}{P \times P_{mc}}$$

C/P = relación molar colesterol / fósforo

C = μ g de colesterol por mg de proteínas

P = μ g de fósforo por mg de proteínas

P_{af} = peso atómico del fósforo (30.98)

P_{mc} = peso molecular del colesterol (386.66)

IV.- RESULTADOS

4. A.- EVOLUCION DEL CONTENIDO EN COLESTEROL EN CEREBRO, HIGADO Y RIÑON A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Se ha estudiado la variación en el contenido en colesterol total, libre y esterificado en cerebro, hígado y riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo como punto de partida de nuestro trabajo puesto que las variaciones en estos parametros pueden servirnos de indicio de los posibles cambios metabólicos que ocurren en el mismo período.

4. A. 1.- VARIACION DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN CEREBRO

En la tabla I aparecen indicados los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de colesterol total, libre y esterificado en cerebro embrionario expresados como mg de colesterol en el órgano completo.

Estos valores se han representado en la figura 1 donde se observa claramente el extraordinario aumento detectado en los niveles de colesterol total, que varían desde 0.5 hasta valores próximos a 6 mg. Este aumento es debido fundamentalmente al colesterol libre ya que los niveles de este parámetro siguen de forma muy próxima y paralela a los de colesterol total. El colesterol esterificado, por el contrario, no varía prácticamente a lo largo del período estudiado, manteniéndose siempre en niveles inferiores a 0.5 mg.

Cuando los resultados se expresan como mg de colesterol observados en cada 100 mg de cerebro (tabla II fig. 2) se aprecia igualmente una marcada acumulación de colesterol, acúmulo que es patente a partir del día 13 y hasta el 19 de desarrollo embrionario, momento a partir del cual se mantienen los niveles e incluso disminuyen un tanto. También en

TABLA I

Evolución en cerebro de embrión de pollo del contenido en colesterol total, libre y esterificado expresado como mg de colesterol en cerebro. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol en cerebro		
	Total	Libre	Esterificado
10	0.43 \pm 0.05	0.38 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01
11	0.58 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
12	0.68 \pm 0.02	0.63 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
13	1.11 \pm 0.04	0.97 \pm 0.04	0.14 \pm 0.02
14	1.67 \pm 0.10	1.48 \pm 0.09	0.19 \pm 0.03
15	1.99 \pm 0.14	1.83 \pm 0.13	0.16 \pm 0.08
16	3.02 \pm 0.08	2.89 \pm 0.09	0.13 \pm 0.02
17	4.38 \pm 0.27	4.09 \pm 0.26	0.29 \pm 0.07
18	5.49 \pm 0.19	5.15 \pm 0.18	0.34 \pm 0.33
19	5.70 \pm 0.15	5.29 \pm 0.15	0.41 \pm 0.06
20	5.48 \pm 0.15	5.28 \pm 0.14	0.20 \pm 0.02
21	5.83 \pm 0.20	5.77 \pm 0.20	0.06 \pm 0.03

El estado y el nivel de colesterol en el cerebro de pollo durante el desarrollo embrionario, momento a partir del cual se ven los niveles e incluso disminuyen en tanto, también

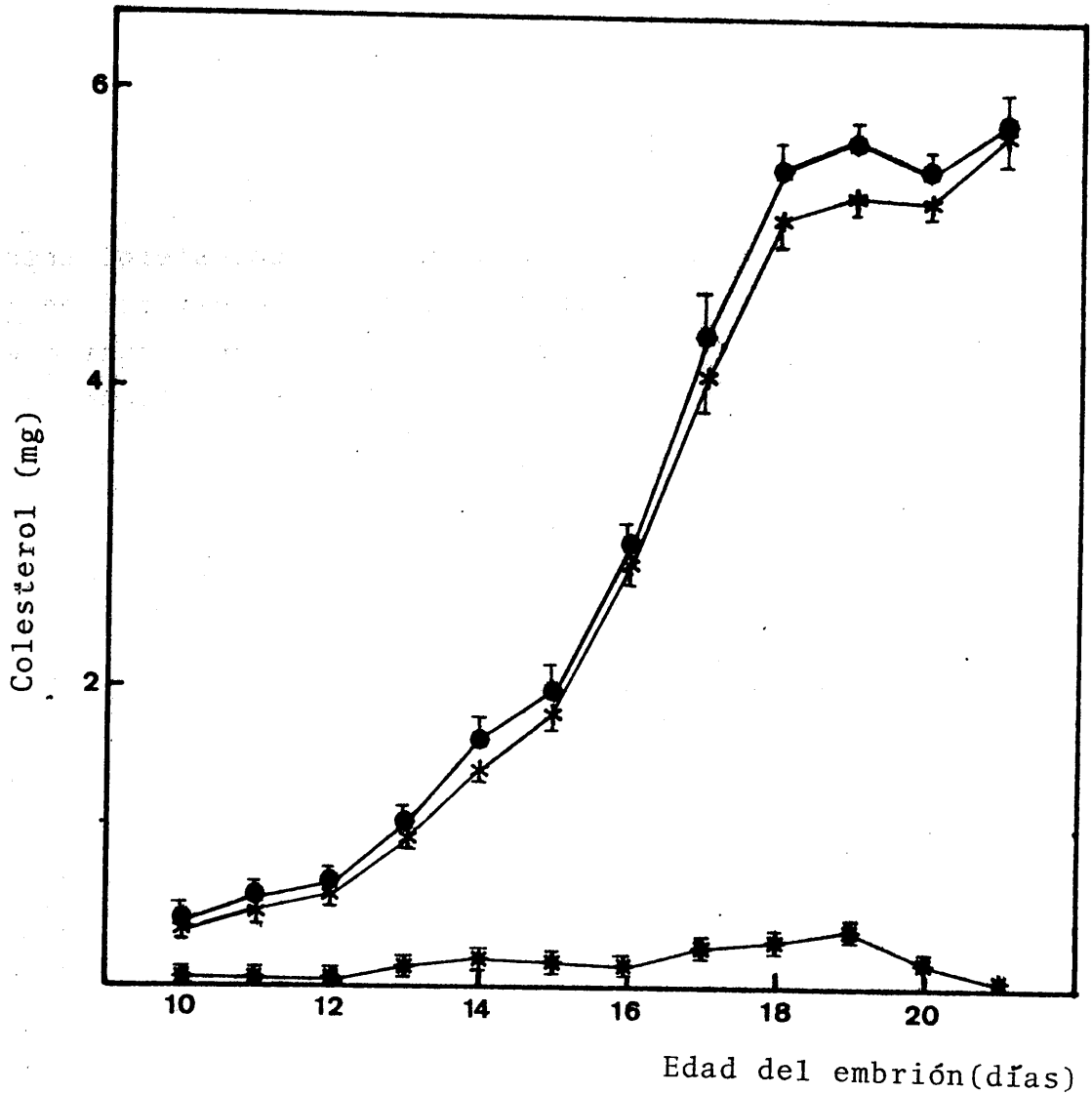


Fig. 1.- Evolución del contenido en colesterol total(●), libre (*) y esterificado (*) en cerebro de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como mg de colesterol en el cerebro completo y son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

TABLA II

Variación en el contenido en colesterol total, libre y esterificado expresado como mg de colesterol en 100 mg de cerebro. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol / 100 mg de cerebro		
	Total	Libre	Esterificado
10	0.304 \pm 0.01	0.260 \pm 0.01	0.04 \pm 0.004
11	0.363 \pm 0.01	0.334 \pm 0.01	0.03 \pm 0.004
12	0.305 \pm 0.01	0.281 \pm 0.01	0.02 \pm 0.003
13	0.312 \pm 0.01	0.273 \pm 0.01	0.04 \pm 0.010
14	0.418 \pm 0.02	0.361 \pm 0.02	0.05 \pm 0.010
15	0.435 \pm 0.02	0.400 \pm 0.02	0.03 \pm 0.010
16	0.496 \pm 0.01	0.475 \pm 0.01	0.02 \pm 0.004
17	0.645 \pm 0.01	0.600 \pm 0.01	0.04 \pm 0.010
18	0.705 \pm 0.02	0.662 \pm 0.02	0.04 \pm 0.004
19	0.752 \pm 0.02	0.698 \pm 0.02	0.05 \pm 0.007
20	0.657 \pm 0.02	0.633 \pm 0.02	0.02 \pm 0.003
21	0.688 \pm 0.02	0.681 \pm 0.02	0.01 \pm 0.003

Los resultados de los análisis de colesterol en el cerebro expresados como mg de colesterol en 100 mg de cerebro son los que se muestran en la tabla II. Los resultados de los análisis de colesterol en el cerebro expresados como mg de colesterol en 100 mg de cerebro son los que se muestran en la tabla II.

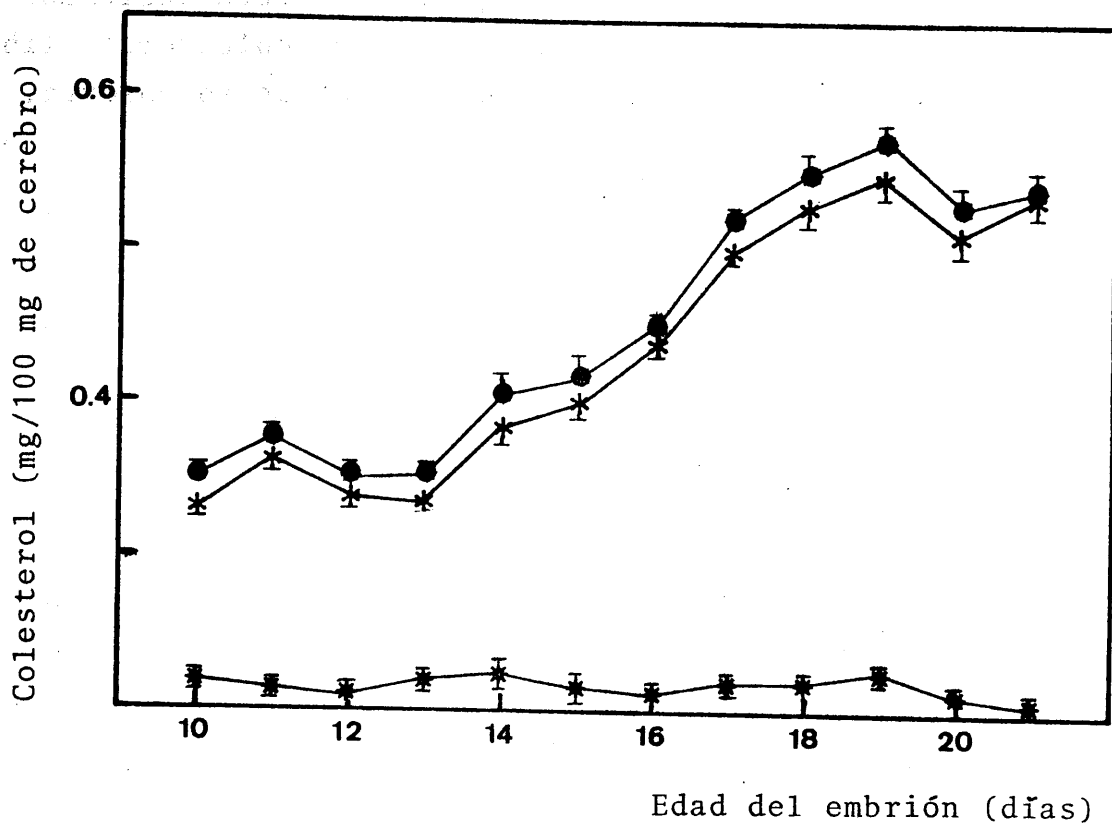


Fig. 2.- Variaciones en el contenido en colesterol total (●), libre (*) y esterificado (*) en cerebro, expresado como mg de colesterol por 100 mg de órgano, a lo largo del desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

este caso el aumento del colesterol total es debido al libre ya que el esterificado se mantiene casi constante.

En la tabla III (fig. 3) aparecen indicados los porcentajes relativos de ambas formas de colesterol, libre y esterificado, en cerebro embrionario. Según se observa, el colesterol libre supone siempre alrededor del 90% del total, e incluso en el momento de la eclosión, el colesterol esterificado supone sólo un 1% del total en cerebro.

4. A. 2. - VARIACION DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN HIGADO

Se ha estudiado la evolución en el contenido en colesterol total, libre y esterificado en hígado desde el día 10 de desarrollo embrionario hasta el momento de la eclosión.

En la tabla IV (fig. 4) aparecen expuestas las variaciones observadas en los niveles de colesterol total, libre y esterificado expresadas como mg de colesterol en el órgano completo. Según se aprecia existe un aumento muy marcado en los niveles de colesterol total sobre todo a partir del día 12 y hasta el momento de la eclosión en donde la concentración de colesterol es muy superior a la de cerebro en este mismo día. A diferencia del cerebro, la acumulación de colesterol hepático es debida fundamentalmente al aumento en los niveles de colesterol esterificado, ya que aunque los niveles de colesterol libre también aumentan a lo largo de la incubación éstos suponen el día 21 solo 3.8 mg frente a 52.7 mg debidos al esterificado.

Cuando se expresan los resultados como mg de colesterol en 100 mg de hígado embrionario (tabla V, fig.5) se observa, como en el caso anterior, un patente aumento en el colesterol total que viene a ser el día 21 unas 20 veces superior

TABLA III

Variación en los porcentajes de colesterol libre y esterificado en cerebro de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	% del colesterol total	
	Libre	Esterificado
10	87.71 \pm 1.25	12.29 \pm 1.25
11	92.22 \pm 1.16	7.78 \pm 1.16
12	92.02 \pm 0.84	7.98 \pm 0.84
13	87.50 \pm 2.20	12.50 \pm 2.20
14	88.91 \pm 1.50	11.09 \pm 1.50
15	91.99 \pm 1.20	8.01 \pm 1.20
16	95.85 \pm 0.71	6.05 \pm 0.71
17	93.37 \pm 1.58	6.63 \pm 1.58
18	93.86 \pm 0.48	6.14 \pm 0.48
19	92.76 \pm 0.97	7.24 \pm 0.97
20	96.39 \pm 0.40	3.61 \pm 0.40
21	98.95 \pm 0.49	1.05 \pm 0.49

embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

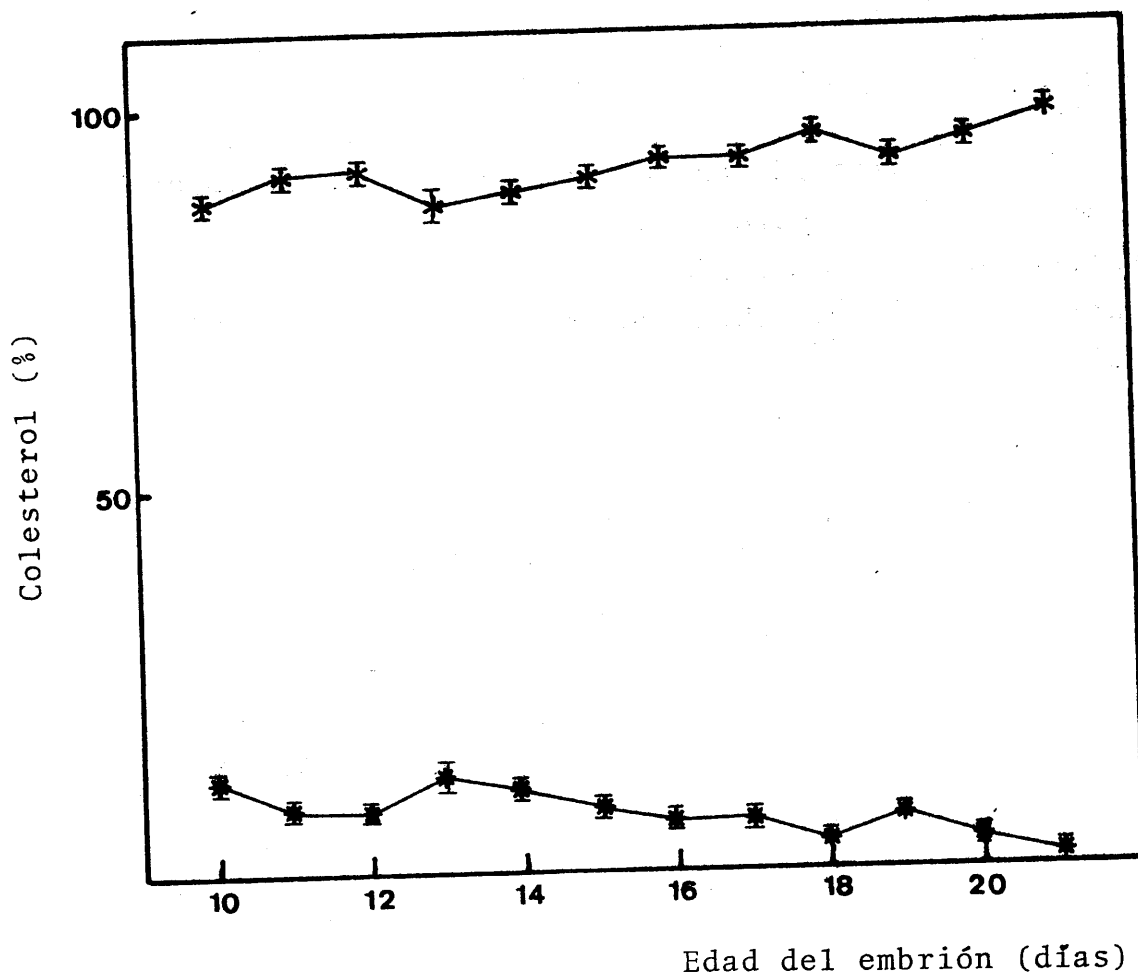


Fig. 3.- Evolución de los porcentajes de colesterol libre (*) y esterificado (*) respecto al total en cerebro de em brión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

TABLA IV

Variación en hígado de embrión de pollo en el contenido en colesterol total, libre y esterificado expresado como mg de colesterol en el órgano completo. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro experiencias. El \pm indica el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol en hígado		
	Total	Libre	Esterificado
10	0.28 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
11	0.18 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01
12	0.29 \pm 0.04	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02
13	0.85 \pm 0.08	0.35 \pm 0.05	0.51 \pm 0.06
14	1.53 \pm 0.11	0.47 \pm 0.04	0.06 \pm 0.08
15	3.09 \pm 0.16	0.57 \pm 0.06	2.52 \pm 0.14
16	8.18 \pm 0.66	1.19 \pm 0.15	6.99 \pm 0.58
17	12.15 \pm 1.60	1.75 \pm 0.34	10.40 \pm 1.39
18	20.38 \pm 1.33	1.10 \pm 0.13	19.28 \pm 1.28
19	25.26 \pm 1.58	2.08 \pm 0.23	23.18 \pm 1.46
20	35.42 \pm 1.47	2.71 \pm 0.23	32.71 \pm 1.37
21	56.56 \pm 1.63	3.04 \pm 0.15	53.52 \pm 1.58

El contenido de colesterol en el hígado de los embriones de pollo se expresa en mg de colesterol en el órgano completo. Los resultados se expresan como la media de al menos cuatro experiencias. El \pm indica el error estándar de la media.

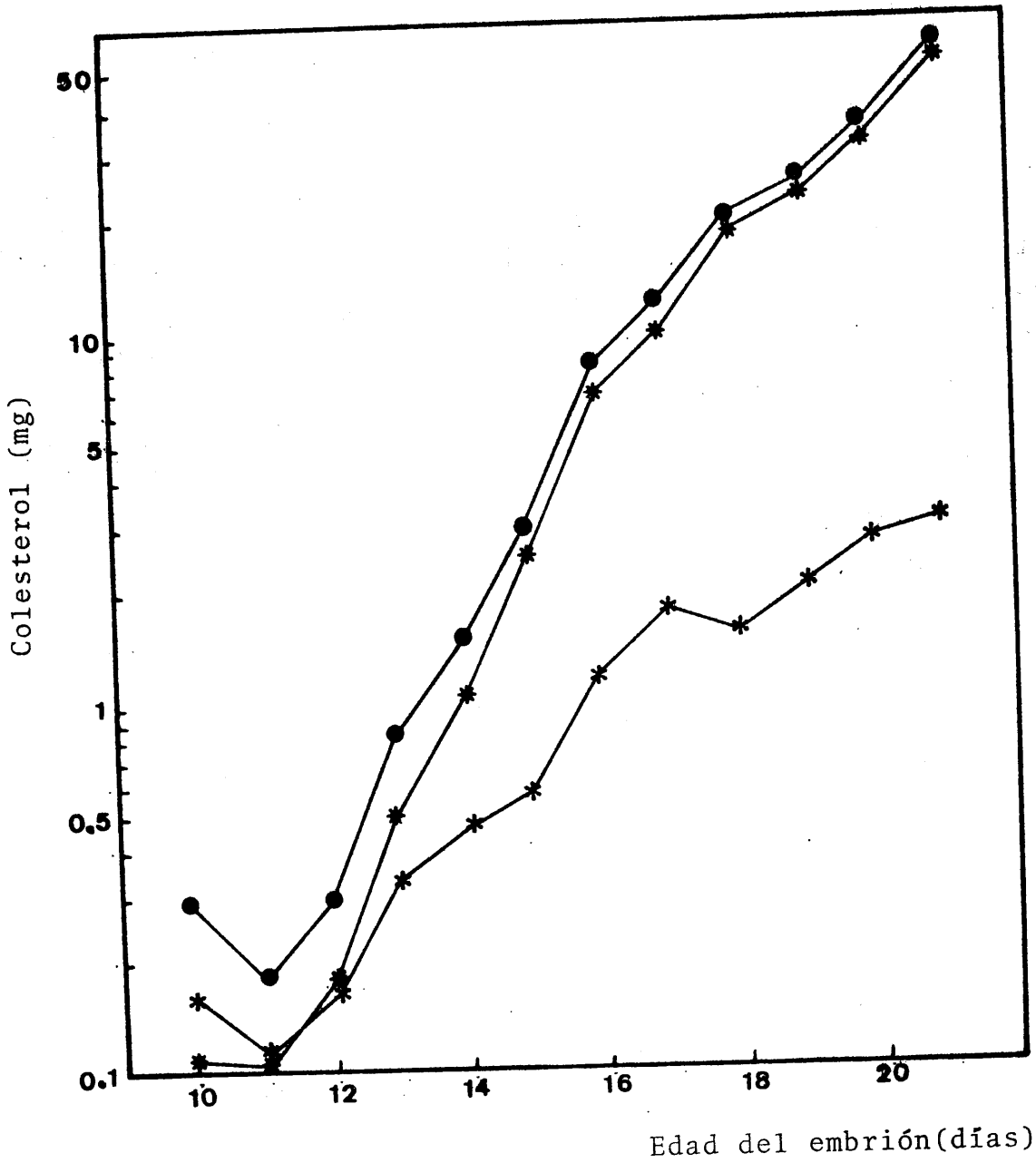


Fig. 4.- Evolución del contenido en colesterol total (●), libre (*) y esterificado (*) en hígado de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan (en escala logarítmica) como mg de colesterol observados en el hígado completo y son media de al menos cuatro experiencias

TABLA V

Evolución en el contenido en colesterol total, libre y esterificado en hígado de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol / 100 mg de hígado		
	Total	Libre	Esterificado
10	0.65 \pm 0.05	0.392 \pm 0.033	0.21 \pm 0.019
11	0.39 \pm 0.02	0.226 \pm 0.013	0.14 \pm 0.009
12	0.41 \pm 0.03	0.224 \pm 0.012	0.33 \pm 0.030
14	0.99 \pm 0.08	0.302 \pm 0.030	0.69 \pm 0.059
15	0.31 \pm 0.09	0.246 \pm 0.027	1.06 \pm 0.076
16	2.32 \pm 0.12	0.338 \pm 0.039	1.98 \pm 0.108
17	3.48 \pm 0.39	0.432 \pm 0.048	3.05 \pm 0.340
18	5.20 \pm 0.28	0.382 \pm 0.030	4.82 \pm 0.261
19	5.52 \pm 0.46	0.454 \pm 0.039	5.07 \pm 0.424
20	6.36 \pm 0.22	0.487 \pm 0.017	5.78 \pm 0.206
21	8.80 \pm 0.19	0.590 \pm 0.087	8.21 \pm 0.197

(2011) ...
... en hígado (*) ...
... mg de colesterol por 100 mg de hígado a lo largo
... los resultados son media de
... M.S. (ob ...)

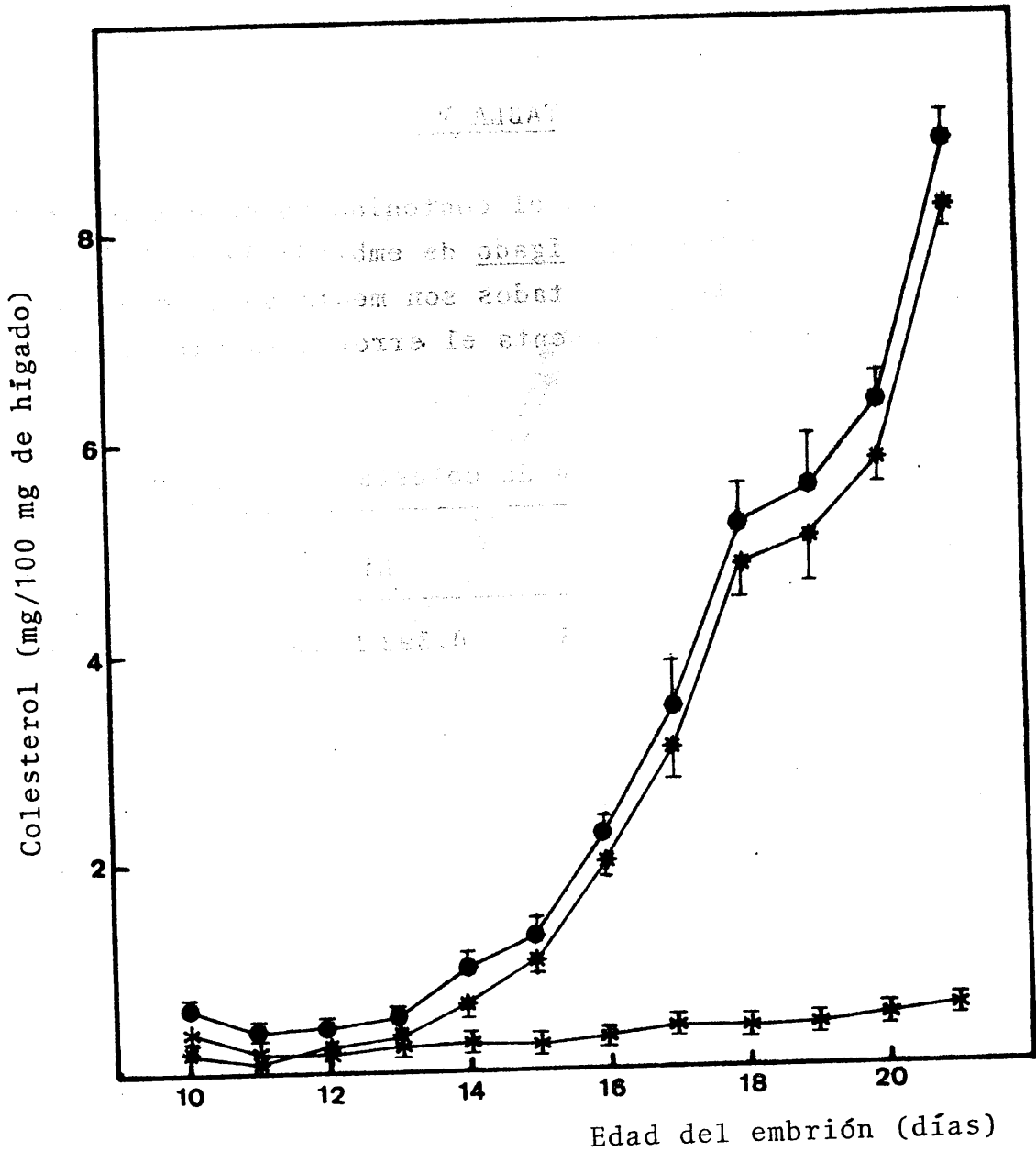


Fig. 5.- Variaciones en el contenido en colesterol total (●), libre (*) y esterificado (*) en hígado, expresados como mg de colesterol por 100 mg de órgano, a lo largo del desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

al detectado los días 10-11 de desarrollo embrionario. También en este caso, la acumulación de colesterol hepático es debida al colesterol esterificado, ya que el colesterol libre aunque aumenta un tanto permanece en niveles mínimos y prácticamente constantes.

Los porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado se han representado en la tabla VII (fig.6). El porcentaje de colesterol libre, que suponía en los días 10-11 de incubación alrededor del 60%, disminuye de forma acusada desde el día 11 produciéndose una inversión en los porcentajes de tal forma que en el día 18 el colesterol libre supone solo un 7% del total. Desde este momento hasta la eclosión los porcentajes de colesterol libre y esterificado se mantienen prácticamente constantes.

4. A. 3. - VARIACION DE LOS NIVELES DE COLESTEROL EN RIÑON

Se han determinado los niveles de colesterol total, libre y esterificado en riñón embrionario entre los días 11 y 21 de desarrollo. Debemos mencionar que al hablar de riñón embrionario nos referimos siempre a la suma de ambos riñones.

En la tabla VII (fig. 7) se han representado los valores obtenidos en cuanto a los niveles de colesterol en el órgano completo. Según se observa también en este órgano existe un patente aumento en los niveles de colesterol total, aumento que es más marcado a partir del día 14 de desarrollo y que continúa hasta el día 20-21. A pesar de esta acumulación de colesterol los niveles de éste en riñón son mucho menores a los existentes en cerebro e hígado. Como en el caso del cerebro la acumulación de colesterol es debida fundamentalmente al colesterol libre. El colesterol esterificado, aunque aumen-

TABLA VI

Porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado en hígado embrionario durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	% del colesterol total	
	Libre	Esterificado
10	64.94 \pm 1.01	35.06 \pm 1.01
11	61.53 \pm 1.30	38.47 \pm 1.30
12	48.36 \pm 2.89	51.64 \pm 2.89
13	40.37 \pm 4.50	59.63 \pm 4.50
14	30.60 \pm 1.79	69.84 \pm 1.79
15	18.77 \pm 1.60	81.23 \pm 1.60
16	14.58 \pm 1.50	85.42 \pm 1.50
17	12.42 \pm 1.05	87.51 \pm 1.05
18	7.35 \pm 0.46	92.65 \pm 0.46
19	8.23 \pm 0.76	91.77 \pm 0.76
20	7.66 \pm 0.56	92.34 \pm 0.56
21	6.71 \pm 0.98	93.29 \pm 0.98

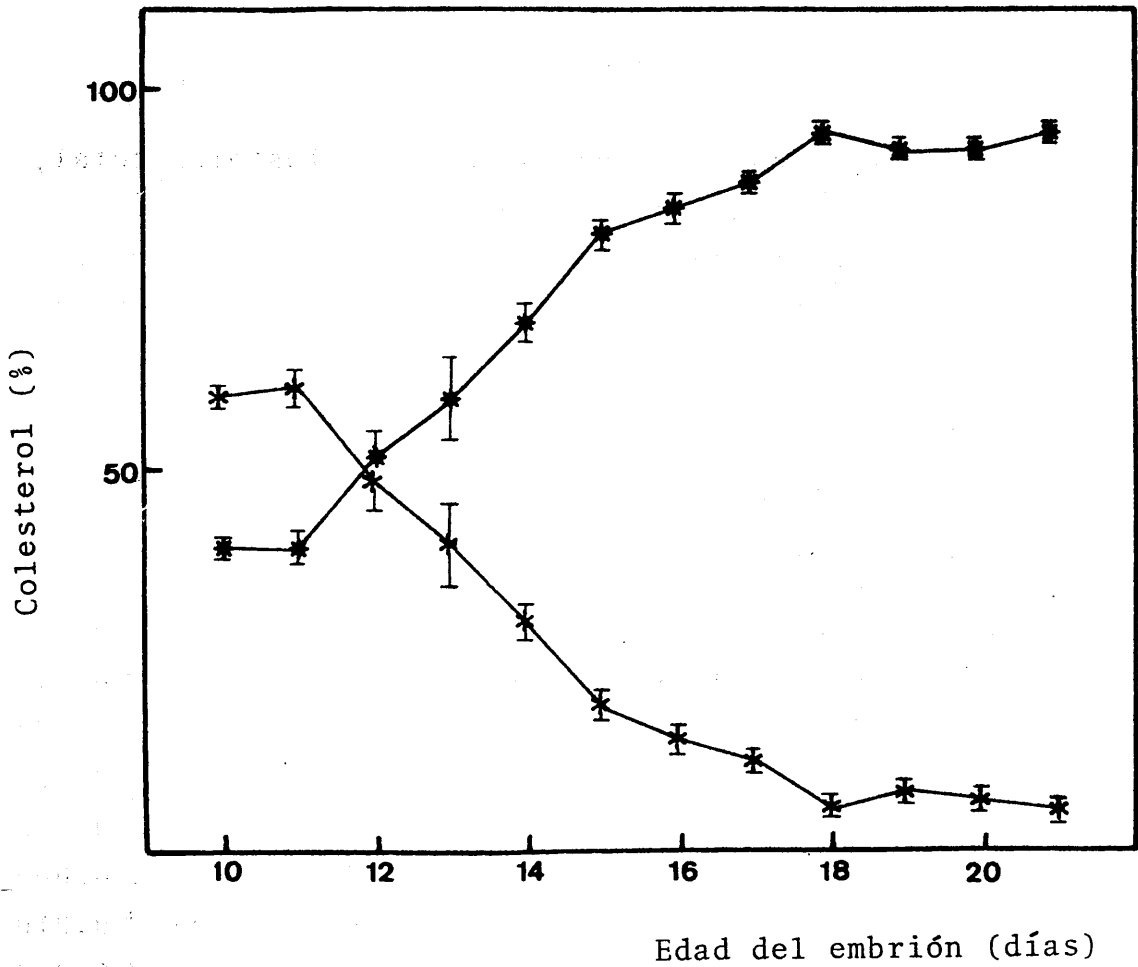


Fig. 6.- Evolución de los porcentajes de colesterol libre (*) y esterificado (*) respecto al total en hígado de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

TABLA VII

Variación en el contenido en colesterol total, libre y esterificado en riñón de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias. Los \pm representan el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol en riñón		
	Total	Libre	Esterificado
11	0.053 \pm 0.01	0.043 \pm 0.008	0.010 \pm 0.008
12	0.088 \pm 0.03	0.068 \pm 0.024	0.019 \pm 0.010
13	0.115 \pm 0.02	0.090 \pm 0.016	0.025 \pm 0.004
14	0.134 \pm 0.02	0.114 \pm 0.017	0.020 \pm 0.003
15	0.266 \pm 0.01	0.210 \pm 0.008	0.056 \pm 0.003
16	0.361 \pm 0.02	0.297 \pm 0.017	0.062 \pm 0.006
17	0.465 \pm 0.03	0.406 \pm 0.028	0.059 \pm 0.010
18	0.504 \pm 0.03	0.456 \pm 0.028	0.047 \pm 0.009
19	0.612 \pm 0.02	0.530 \pm 0.020	0.081 \pm 0.009
20	0.708 \pm 0.01	0.624 \pm 0.013	0.083 \pm 0.006
21	0.714 \pm 0.04	0.650 \pm 0.036	0.063 \pm 0.006

Los resultados de los análisis de colesterol en riñón de pollo durante el desarrollo son los que se muestran en la tabla VII. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y sus errores estándar.

M. S. S.

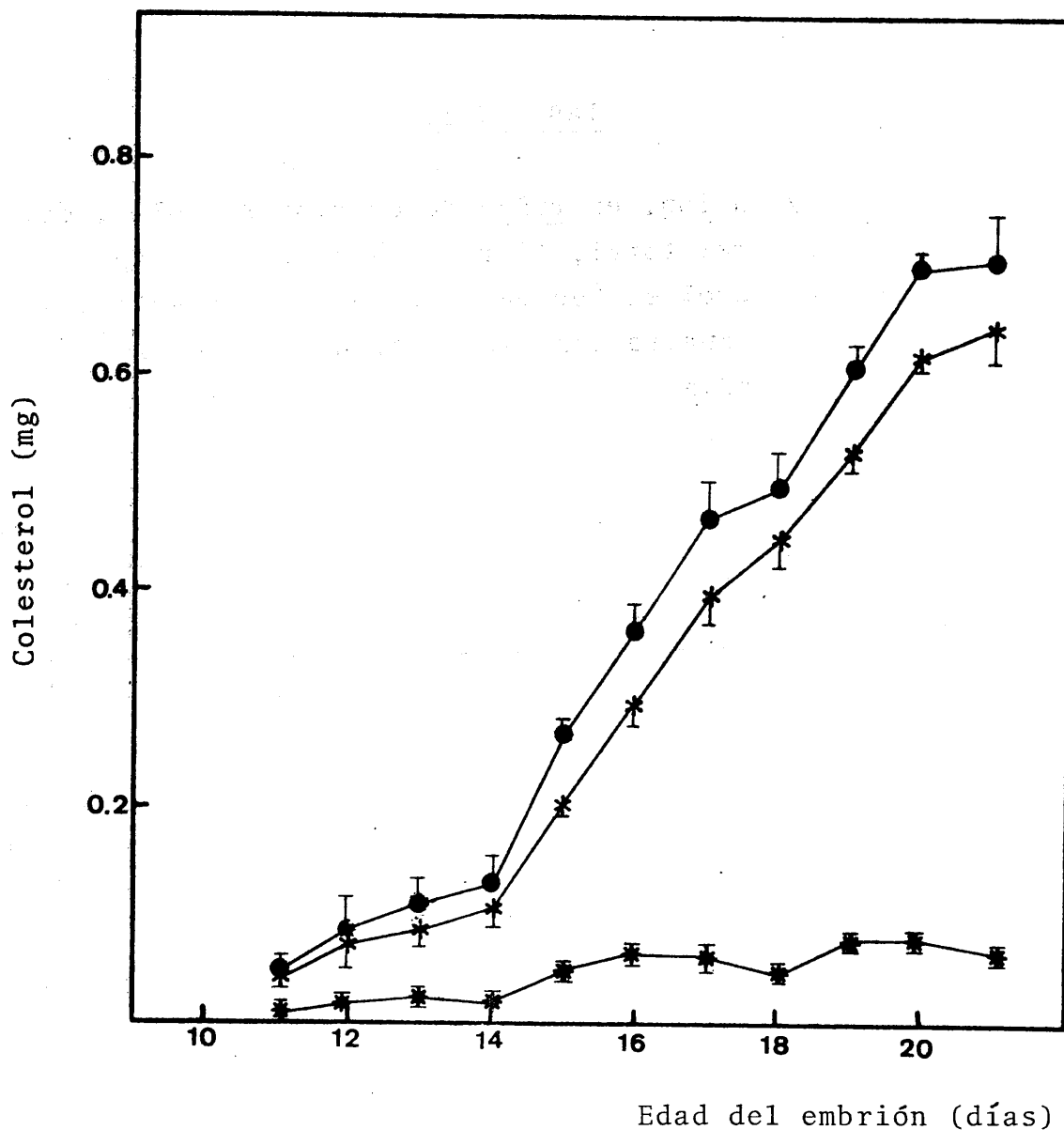


Fig. 7.- Evolución del contenido en colesterol total (●), libre (*) y esterificado (*) en riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como mg de colesterol observados en ambos riñones, siendo media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

TABLA VIII

Evolución, en riñón de embrión de pollo, del contenido en colesterol total, libre y esterificado expresados como mg de colesterol en 100 mg de riñón. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias. El \pm significa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	mg de colesterol / 100 mg de riñón		
	Total	Libre	Esterificado
11	0.461 \pm 0.03	0.378 \pm 0.030	0.083 \pm 0.018
12	0.463 \pm 0.01	0.360 \pm 0.025	0.101 \pm 0.024
13	0.462 \pm 0.03	0.361 \pm 0.024	0.101 \pm 0.008
14	0.442 \pm 0.01	0.377 \pm 0.012	0.065 \pm 0.009
15	0.414 \pm 0.02	0.327 \pm 0.016	0.086 \pm 0.005
16	0.425 \pm 0.01	0.349 \pm 0.008	0.075 \pm 0.006
17	0.436 \pm 0.02	0.381 \pm 0.020	0.055 \pm 0.011
18	0.444 \pm 0.01	0.402 \pm 0.028	0.042 \pm 0.008
19	0.456 \pm 0.01	0.395 \pm 0.011	0.060 \pm 0.006
20	0.428 \pm 0.05	0.377 \pm 0.044	0.051 \pm 0.006
21	0.410 \pm 0.01	0.373 \pm 0.009	0.037 \pm 0.003

El contenido de colesterol en el riñón de pollo, expresado en mg de colesterol por 100 mg de riñón, aumenta con la edad del embrión, desde los 11 días hasta los 18 días, para disminuir a los 21 días. Este aumento se debe a la acumulación de colesterol en el riñón, que se produce a partir de los 11 días de vida del embrión.

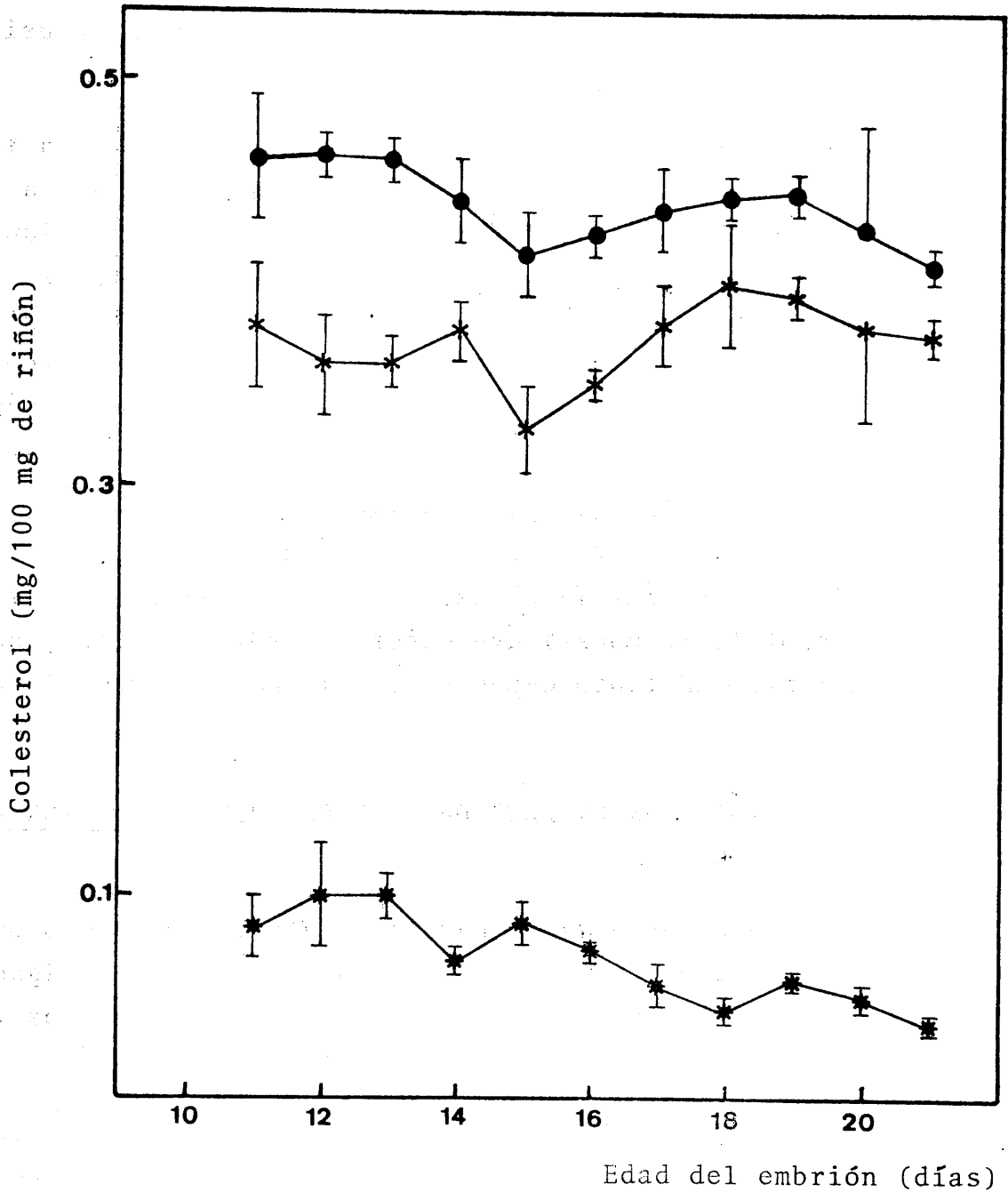


Fig. 8.- Variaciones en el contenido en colesterol total (●), libre (*) y esterificado (*·) en riñón expresados como mg de colesterol por 100 mg de órgano a lo largo del desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.



ta un tanto desde el día 10 hasta el momento de la eclosión, se halla en niveles mínimos.

El nivel de colesterol expresado como mg en 100 mg de tejido fresco (mg/100 mg) no varía prácticamente a lo largo del período estudiado e incluso parece disminuir un tanto (tabla VIII, fig. 8). Mientras los niveles de colesterol esterificado son mínimos y parecen disminuir hacia el final del período de incubación, el colesterol esterificado no experimenta grandes variaciones y se halla en niveles netamente superiores.

El porcentaje de colesterol libre, según aparece indicado en la tabla IX (fig. 9), es siempre superior al de esterificado como ocurría en cerebro pero a diferencia de éste, el colesterol libre constituye menos del 90% del total, aunque parece aumentar un tanto desde el día 15 hasta el momento de la eclosión.

4. A. 4. - CAMBIOS EN EL PESO DE CEREBRO, HIGADO Y RIÑÓN EMBRIONARIO

Se ha estudiado, paralelamente al contenido en colesterol, la evolución del peso fresco de cerebro, hígado y riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados aparecen reflejados en la tabla X (fig. 10).

El peso del cerebro es en cualquier momento del desarrollo embrionario netamente superior al del hígado o riñón. Todos los órganos estudiados aumentan su peso de forma notable entre los días 10 y 21 de desarrollo embrionario como es lógico en la etapa de desarrollo estudiada que coincide con un aumento muy marcado del peso del embrión. En el riñón, a pesar de que aumenta su peso de forma acusada, los valores obtenidos son mucho menores que los de cerebro o hígado.

TABLA IX

Variación en el porcentaje de colesterol libre y esterificado, en riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro experiencias. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	% del colesterol total	
	Libre	Esterificado
11	82.00 \pm 3.74	18.00 \pm 3.74
12	78.21 \pm 5.13	21.79 \pm 5.13
13	78.08 \pm 1.02	21.92 \pm 1.02
14	85.25 \pm 1.93	14.75 \pm 1.93
15	79.06 \pm 0.76	20.94 \pm 0.76
16	82.33 \pm 1.40	17.67 \pm 1.40
17	87.28 \pm 2.40	12.72 \pm 2.40
18	90.61 \pm 1.60	9.39 \pm 1.60
19	96.65 \pm 1.37	13.35 \pm 1.37
20	88.18 \pm 0.78	11.22 \pm 0.78
21	91.04 \pm 0.69	8.96 \pm 0.69

orden de los resultados...
de pollos de desarrollo...
de los resultados y van comparados...
M.S.

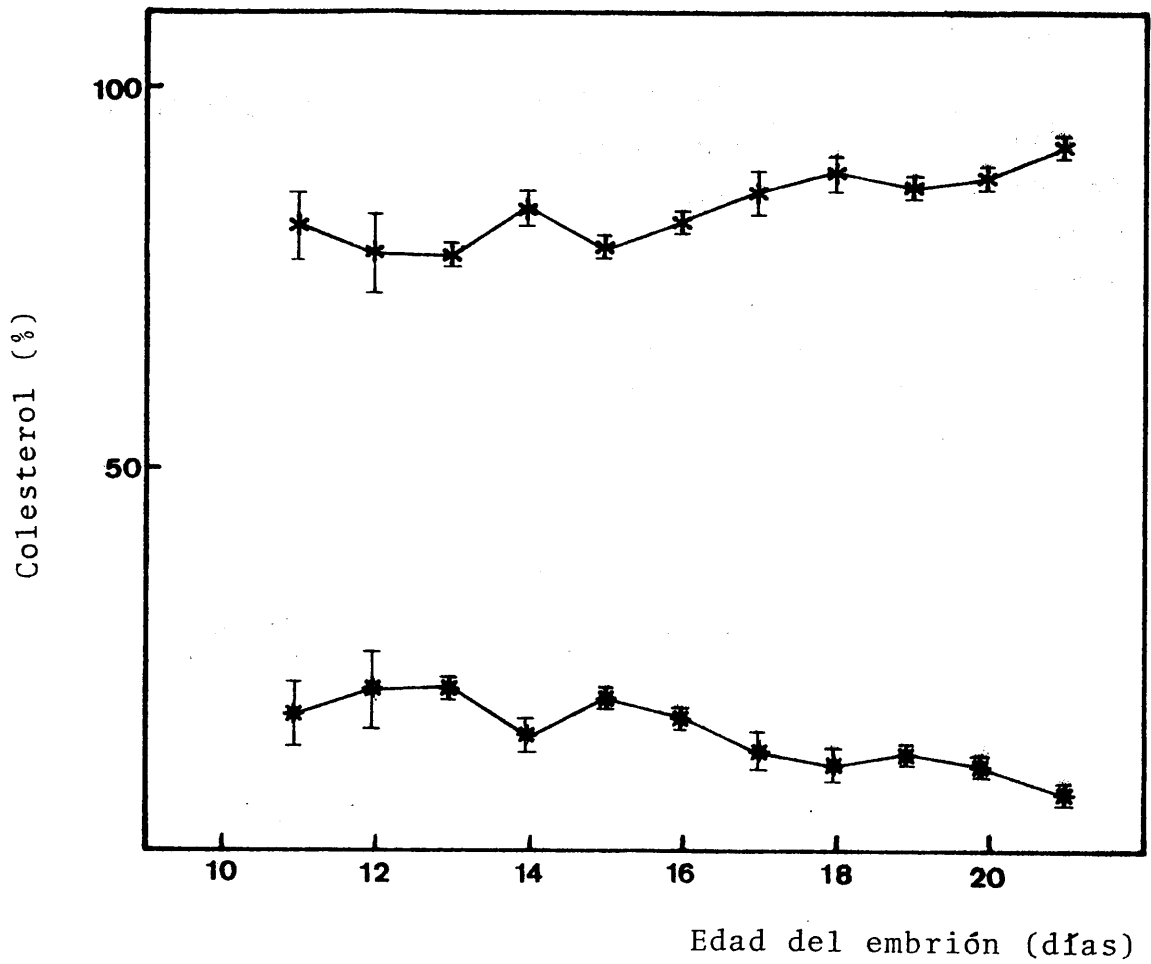


Fig. 9.- Evolución de los porcentajes de colesterol libre (*) y esterificado (*) respecto al total, en riñón de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro experiencias y van acompañados del S.E.M.

TABLA X

Evolución del peso fresco de cerebro, hígado y riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo. Los resultados se expresan como media de al menos veinte pollos. El \pm representa el error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Peso fresco en mg		
	Cerebro	Hígado	Riñón
10	132 \pm 8	35 \pm 3	---
11	160 \pm 7	60 \pm 6	11 \pm 1
12	274 \pm 10	87 \pm 7	19 \pm 2
13	317 \pm 10	144 \pm 13	27 \pm 1
14	408 \pm 13	205 \pm 11	31 \pm 5
15	422 \pm 18	257 \pm 11	63 \pm 5
16	527 \pm 17	282 \pm 16	85 \pm 3
17	588 \pm 20	359 \pm 17	92 \pm 7
18	681 \pm 32	446 \pm 21	107 \pm 6
19	746 \pm 34	503 \pm 20	135 \pm 5
20	798 \pm 47	556 \pm 16	166 \pm 10
21	846 \pm 74	645 \pm 25	173 \pm 8

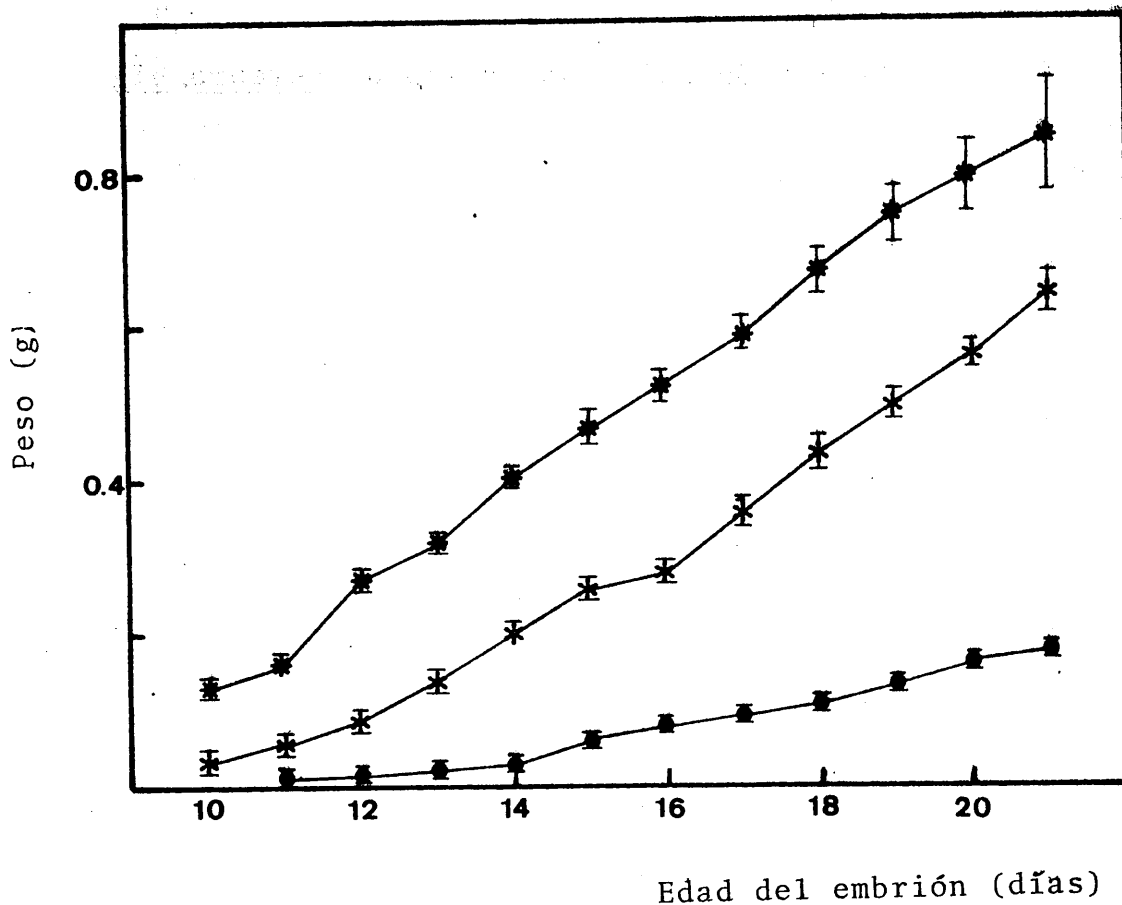


Fig. 10.- Variaciones en el peso fresco del cerebro (*), hígado (*) y riñón (●) de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos veinte pollos y van acompañados del S.E.M.

4. B. - EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS MEVALONATO CINASA, FOSFOMEVALONATO CINASA Y PIROFOSFOMEVALONATO DESCARBOXILASA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Teniendo en cuenta los grandes cambios metabólicos que tienen lugar en los tejidos embrionarios nos pareció conveniente determinar la actividad de las tres enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del MVA en cerebro, hígado, intestino y riñón de embrión de pollo a lo largo del desarrollo.

Cada una de las experiencias realizadas a lo largo de la edad se han efectuado sobre embriones procedentes de una misma tanda de huevos e incubados al mismo tiempo, para evitar fluctuaciones que no correspondieran a variaciones normales en la actividad enzimática.

4. B. 1. - CAMBIOS EN CEREBRO

Se ha realizado el estudio de las actividades mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa en cerebro durante el desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos aparecen indicados en la tabla XI (fig. 11). Según se observa la actividad mevalonato cinasa no varía de forma muy acusada entre los días 10 y 15 de desarrollo embrionario pero a partir de este momento, y hasta la eclosión, la actividad aumenta de forma patente. La fosfomevalonato cinasa, por el contrario, no varía prácticamente a lo largo del período estudiado. Según se indica en la tabla XI la cantidad de PMVA es siempre superior a la de PPMVA.

TABLA XI

Variación, en el cerebro embrionario, de la fosforilación y descarboxilación del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estándar de la media. La actividad PPMVA descarboxilasa representa la cantidad de CO₂ observado. La actividad PMVA cinasa representa la suma de CO₂ y PPMVA. La actividad MVA cinasa representa la suma de CO₂ PMVA y PPMVA.

Edad del embrión (días)	Derivados fosforilados observados (nmol/mg/30min)		Actividad específica (nmol/mg prot/30min)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
10	64.50 ± 1.05	112.40 ± 2.07	24.45 ± 2.75	88.95 ± 2.94	201.35 ± 3.60
11	86.45 ± 5.58	84.21 ± 7.52	24.19 ± 2.14	110.64 ± 5.98	194.85 ± 9.61
12	58.12 ± 1.97	91.51 ± 2.33	21.91 ± 0.95	80.03 ± 2.19	171.54 ± 3.20
13	70.13 ± 2.76	127.22 ± 3.71	21.86 ± 1.55	91.99 ± 3.17	219.21 ± 4.88
14	102.16 ± 3.80	76.39 ± 3.60	27.82 ± 1.08	129.98 ± 3.95	206.37 ± 5.34
15	87.53 ± 5.30	59.36 ± 1.40	29.56 ± 2.62	117.09 ± 5.91	176.45 ± 6.08
16	79.72 ± 1.67	109.35 ± 1.34	32.62 ± 1.72	112.34 ± 2.40	189.07 ± 2.75
17	65.54 ± 3.02	118.40 ± 7.20	32.84 ± 0.74	97.98 ± 2.11	216.38 ± 7.84
18	93.64 ± 8.40	117.21 ± 2.81	43.33 ± 4.03	136.97 ± 9.32	254.18 ± 9.73
19	81.79 ± 6.23	164.48 ± 3.80	43.09 ± 5.63	124.88 ± 8.40	289.36 ± 9.22
20	93.75 ± 5.80	180.07 ± 7.95	35.16 ± 1.60	128.91 ± 6.02	308.98 ± 9.97
21	56.24 ± 1.21	230.41 ± 3.39	24.04 ± 2.04	80.28 ± 2.37	310.69 ± 4.14

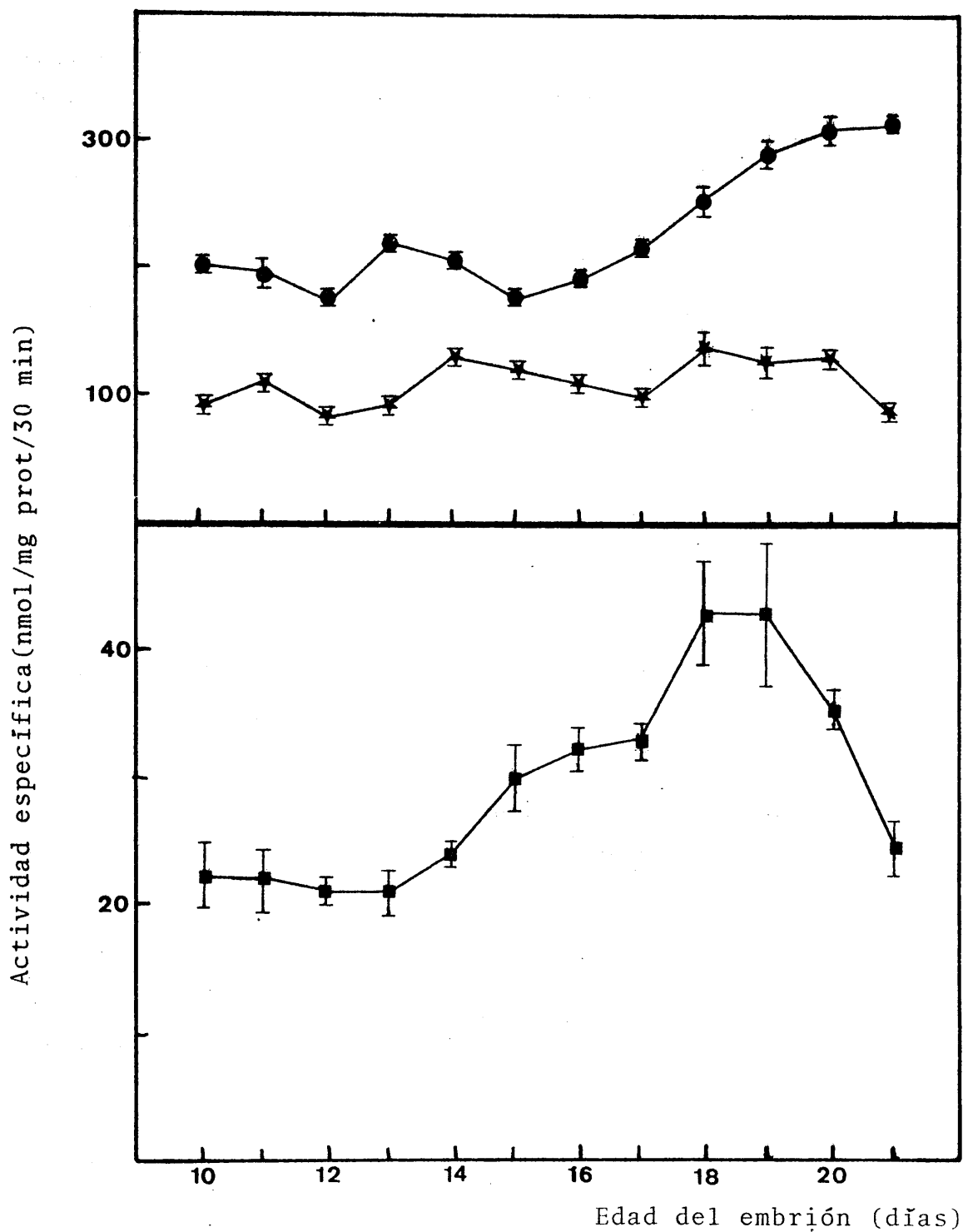


Fig. 11.- Variaciones en las actividades enzimáticas: mevalonato cinasa (●), fosfomevalonato cinasa (★) y pirofosfomevalonato descarboxilasa (■) en cerebro de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos tres experiencias \pm S.E.M.

La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa, que es netamente inferior a la de las otras enzimas, sufre un claro aumento duplicándose su actividad desde el día 13 hasta el 18-19 de incubación para descender más tarde a niveles semejantes a los iniciales en el momento de la eclosión.

4. B. 2. - CAMBIOS EN HIGADO

Se han estudiado las actividades mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa en hígado, desde el día 10 al 21 de desarrollo embrionario.

La actividad mevalonato cinasa, que entre los días 10 y 13 se mantienen casi constante, sufre una disminución el día 15 y experimenta más tarde un aumento recuperándose los valores de actividad iniciales en el día 20 de incubación (tabla XII , fig. 12).

En la misma tabla y figura se ha representado la actividad fosfomevalonato cinasa que, según se observa, no varía de forma notable a lo largo del período de incubación.

La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa hepática se mantiene en niveles muy bajos y en general muy poco variables. En todo caso, parece observarse una ligera disminución en la actividad de la enzima que oscila desde valores próximos a 10 hasta valores de $6 \text{ nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$.

4. B. 3. - CAMBIOS EN INTESTINO

En la tabla XIII (fig. 13) aparecen indicadas las variaciones observadas en las actividades mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y pirofosfomevalonato descarboxilasa de intestino a lo largo del desarrollo embrionario.

TABLA XII

Variación en el hígado embrionario de la fosforilación y descarboxilación del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estándar de la media. La actividad PPMVA descarboxilasa representa la cantidad de CO₂ desprendido. La actividad PMVA cinasa representa la suma de CO₂ y PPMVA. La actividad MVA cinasa representa la suma de CO₂ PMVA y PPMVA observado.

Edad del embrión (días)	Derivados fosforilados observados (nmol/mg/30min)		Actividad específica (nmol / mg prot / 30 min)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
10	110.9 \pm 8.75	165.1 \pm 5.54	10.74 \pm 0.62	121.6 \pm 8.77	286.7 \pm 10.37
11	143.7 \pm 11.28	127.5 \pm 9.56	10.79 \pm 1.38	154.5 \pm 11.36	282-1 \pm 17.69
12	129.2 \pm 9.59	146.3 \pm 8.60	10.49 \pm 1.24	140.0 \pm 9.67	275.9 \pm 12.94
13	132.1 \pm 4.13	143.8 \pm 3.74	6.41 \pm 0.28	138.5 \pm 4.14	282.4 \pm 5.58
14	162.3 \pm 17.80	88.6 \pm 7.06	10.08 \pm 1.29	172.4 \pm 17.84	260.9 \pm 19.90
15	106.7 \pm 7.35	61.2 \pm 4.70	8.08 \pm 0.20	114.8 \pm 7.35	176.0 \pm 8.73
16	108.7 \pm 8.04	76.7 \pm 4.15	8.64 \pm 0.74	117.4 \pm 8.07	194.1 \pm 9.08
17	103.7 \pm 2.37	86.2 \pm 1.07	6.01 \pm 0.27	109.7 \pm 2.39	196.0 \pm 2.61
18	117.6 \pm 5.17	104.8 \pm 8.96	6.18 \pm 0.74	123.8 \pm 5.22	228.6 \pm 10.37
19	115.1 \pm 7.46	113.1 \pm 4.89	6.10 \pm 0.50	121.2 \pm 7.48	234.3 \pm 8.93
20	116.8 \pm 6.66	146.8 \pm 3.69	7.10 \pm 0.98	123.9 \pm 6.73	270.8 \pm 7.68
21	113.8 \pm 10.91	78.4 \pm 5.49	6.17 \pm 0.18	120.0 \pm 10.91	192.2 \pm 12.21

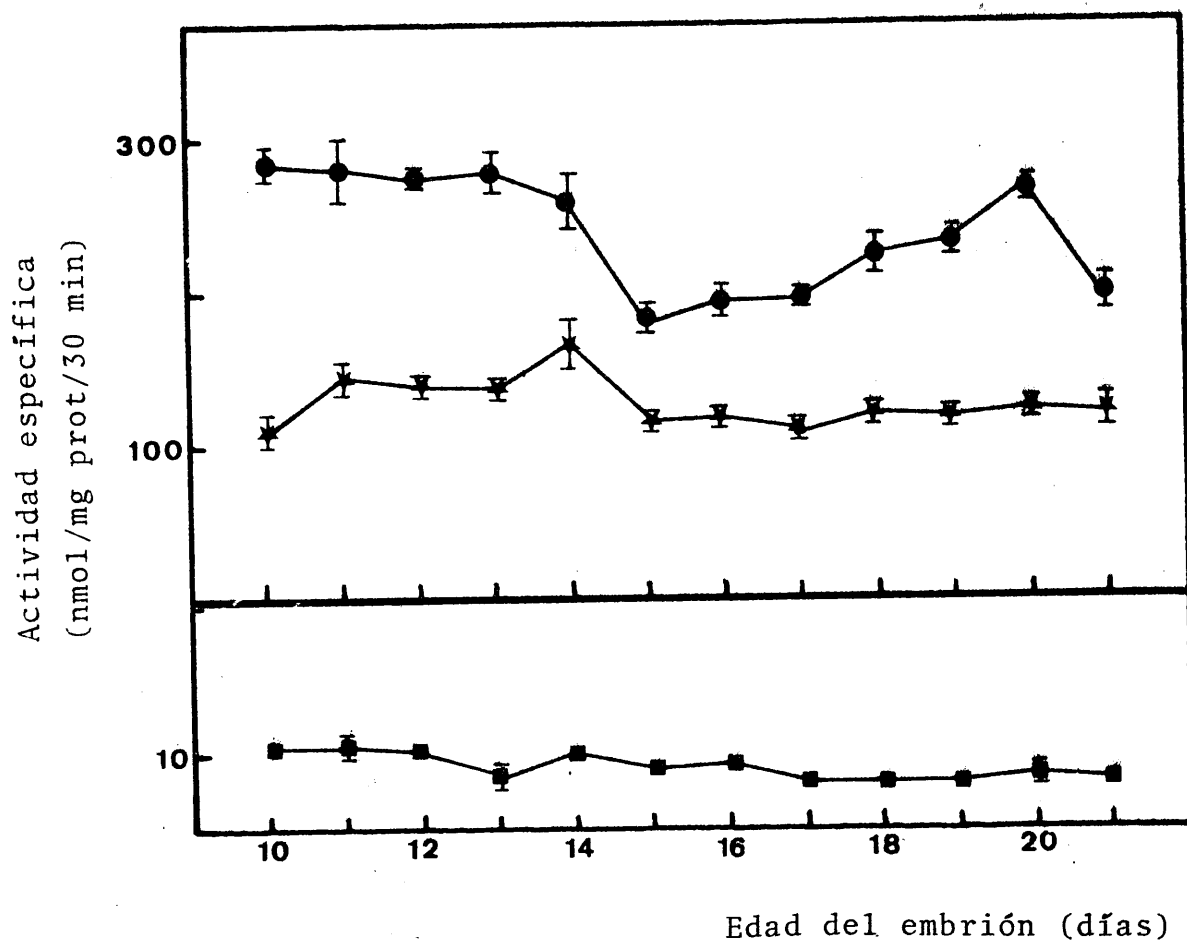


Fig. 12.- Variaciones en las actividades enzimáticas: mevalonato cinasa (●), fosfomevalonato cinasa (★) y pirofosfomevalonato descarboxilasa (■) en hígado de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos tres experiencias \pm S.E.M.

TABLA XIII

Variación en el intestino embrionario de la fosforilación y descarboxilación del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estándar de la media. La actividad PPMVA descarboxilasa representa la cantidad de CO₂ observado. La actividad PMVA cinasa representa la suma de CO₂ y PPMVA. La actividad MVA cinasa representa la suma de CO₂ PMVA y PPMVA.

Edad del embrión (días)	Derivados fosforilados observados (nmol/mg/30min)		Actividad específica (nmol/mg prot/30min)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
10	106.1 \pm 5.76	254.2 \pm 11.25	1.99 \pm 0.48	108.1 \pm 5.78	360.2 \pm 12.65
11	105.2 \pm 6.38	250.5 \pm 14.22	7.20 \pm 1.26	112.4 \pm 6.50	355.7 \pm 15.64
12	94.4 \pm 9.17	221.5 \pm 15.28	7.68 \pm 0.71	102.1 \pm 9.20	323.6 \pm 18.83
13.	127.2 \pm 15.79	217.6 \pm 13.03	7.37 \pm 0.54	134.5 \pm 15.80	344.8 \pm 20.48
14	162.2 \pm 9.60	115.8 \pm 8.71	12.35 \pm 0.68	174.5 \pm 9.63	277.9 \pm 12.98
15	117.9 \pm 9.36	80.9 \pm 2.30	11.77 \pm 1.14	129.6 \pm 9.43	198.9 \pm 9.71
16	139.8 \pm 7.71	89.3 \pm 6.52	11.11 \pm 0.89	150.9 \pm 7.76	229.1 \pm 10.14
17	117.5 \pm 4.36	111.7 \pm 11.05	9.43 \pm 1.10	126.9 \pm 4.50	238.6 \pm 11.93
18	149.4 \pm 10.32	109.3 \pm 7.07	5.45 \pm 1.09	154.9 \pm 10.38	258.7 \pm 12.56
19	104.9 \pm 12.07	128.7 \pm 13.21	8.30 \pm 0.78	113.2 \pm 12.10	233.5 \pm 17.91
20	98.1 \pm 6.22	129.8 \pm 10.87	10.01 \pm 1.02	108.1 \pm 6.30	227.9 \pm 12.57
21	49.2 \pm 0.42	135.4 \pm 4.18	8.63 \pm 0.59	57.8 \pm 0.72	184.6 \pm 4.24

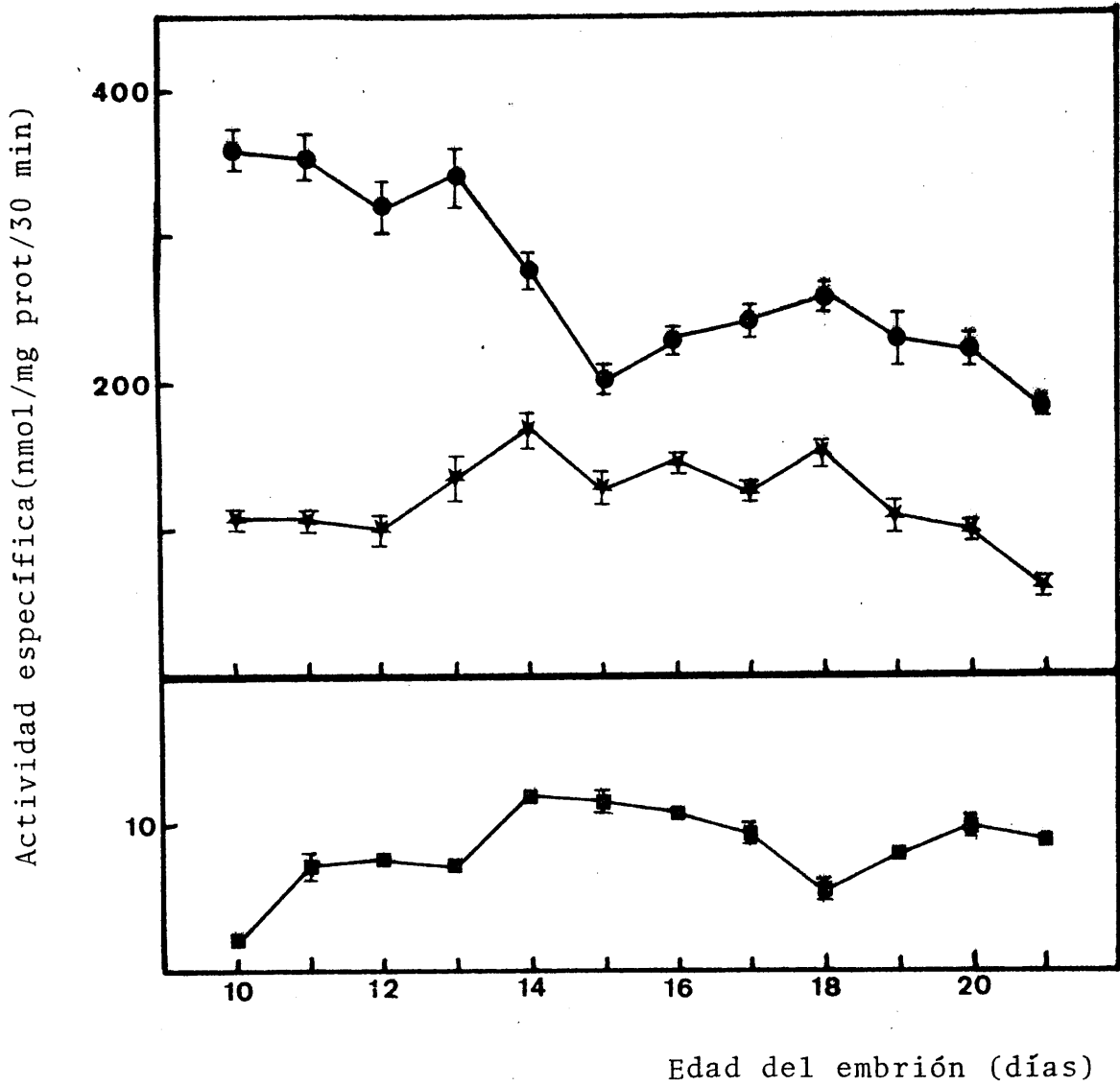


Fig. 13.- Variaciones en las actividades enzimáticas: mevalonato cinasa (●), fosfomevalonato cinasa (★) y pirofosfomevalonato descarboxilasa (■) en intestino de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos tres experiencias \pm S.E.M.

La mevalonato cinasa sufre una disminución notable en su actividad desde el día 10 al 15 de desarrollo embrionario, manteniéndose más tarde en niveles inferiores pero casi invariables.

Tampoco en este caso, como en el resto de los órganos, la actividad fosfomevalonato cinasa presenta variaciones muy acusadas de actividad manteniéndose dentro de unos márgenes limitados durante los días estudiados.

La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa ofrece un patente aumento desde el día 10 al 14, momento a partir del cual se mantiene o incluso disminuye un tanto pero de forma poco acusada.

4. B. 4. - CAMBIOS EN RIÑON

Las variaciones observadas en las actividades enzimáticas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del MVA en riñón de embrión de pollo se han representado en la tabla XIV (fig.14).

La actividad mevalonato cinasa, ofrece unos niveles un tanto variables oscilando en pequeños períodos de tiempo. Sin embargo, en conjunto, no se aprecian grandes variaciones en el patrón de desarrollo.

La actividad fosfomevalonato cinasa no varía sensiblemente, aunque los valores obtenidos entre los días 17 y 21 de desarrollo son un tanto inferiores a los determinados entre 11 y 16 días.

La pirofosfomevalonato descarboxilasa sufre un aumento en su actividad el día 11 manteniéndose en niveles elevados, aunque inferiores a los observados en cerebro, desde el día 12 al 15 y descendiendo desde este momento hasta la eclosión a niveles más bajos.

TABLA XIV

Variación en el riñón embrionario de la fosforilación y descarboxilación del MVA. Los resultados se expresan como la media de tres experiencias. El \pm representa el error estándar de la media. La actividad PPMVA descarboxilasa representa la cantidad de CO₂ observado. La actividad PMVA cinasa representa la suma de CO₂ y PPMVA. La actividad MVA cinasa representa la suma de CO₂ PMVA y PPMVA observados.

Edad del embrión (días)	Derivados fosforilados observados (nmol/mg/30min)		Actividad específica (nmol/mg prot/30min)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
11	89.5 \pm 7.84	121.1 \pm 10.12	8.17 \pm 0.88	97.8 \pm 7.89	210.7 \pm 12.83
12	84.1 \pm 3.21	145.9 \pm 8.72	15.97 \pm 0.39	100.1 \pm 3.23	230.0 \pm 9.30
13	68.7 \pm 7.32	176.1 \pm 14.31	16.69 \pm 0.81	85.4 \pm 7.36	244.8 \pm 16.09
14	79.2 \pm 5.43	175.0 \pm 10.15	16.50 \pm 1.22	95.7 \pm 5.57	254.3 \pm 11.58
15	101.0 \pm 5.72	96.2 \pm 6.86	16.78 \pm 0.14	117.8 \pm 5.72	197.2 \pm 8.93
16	129.4 \pm 8.49	131.7 \pm 12.24	12.86 \pm 1.55	142.3 \pm 8.63	261.1 \pm 14.98
17	51.8 \pm 2.48	123.4 \pm 12.52	5.78 \pm 0.51	57.5 \pm 2.53	175.1 \pm 12.72
18	74.4 \pm 6.07	177.9 \pm 9.29	8.64 \pm 0.99	82.9 \pm 6.15	252.3 \pm 11.14
19	84.2 \pm 4.73	152.3 \pm 6.88	7.39 \pm 1.14	91.6 \pm 4.87	236.5 \pm 8.43
20	68.5 \pm 5.15	227.8 \pm 3.26	9.25 \pm 1.13	77.7 \pm 5.27	296.3 \pm 6.20
21	39.2 \pm 0.47	136.2 \pm 2.83	7.83 \pm 0.69	47.0 \pm 0.83	175.4 \pm 2.95

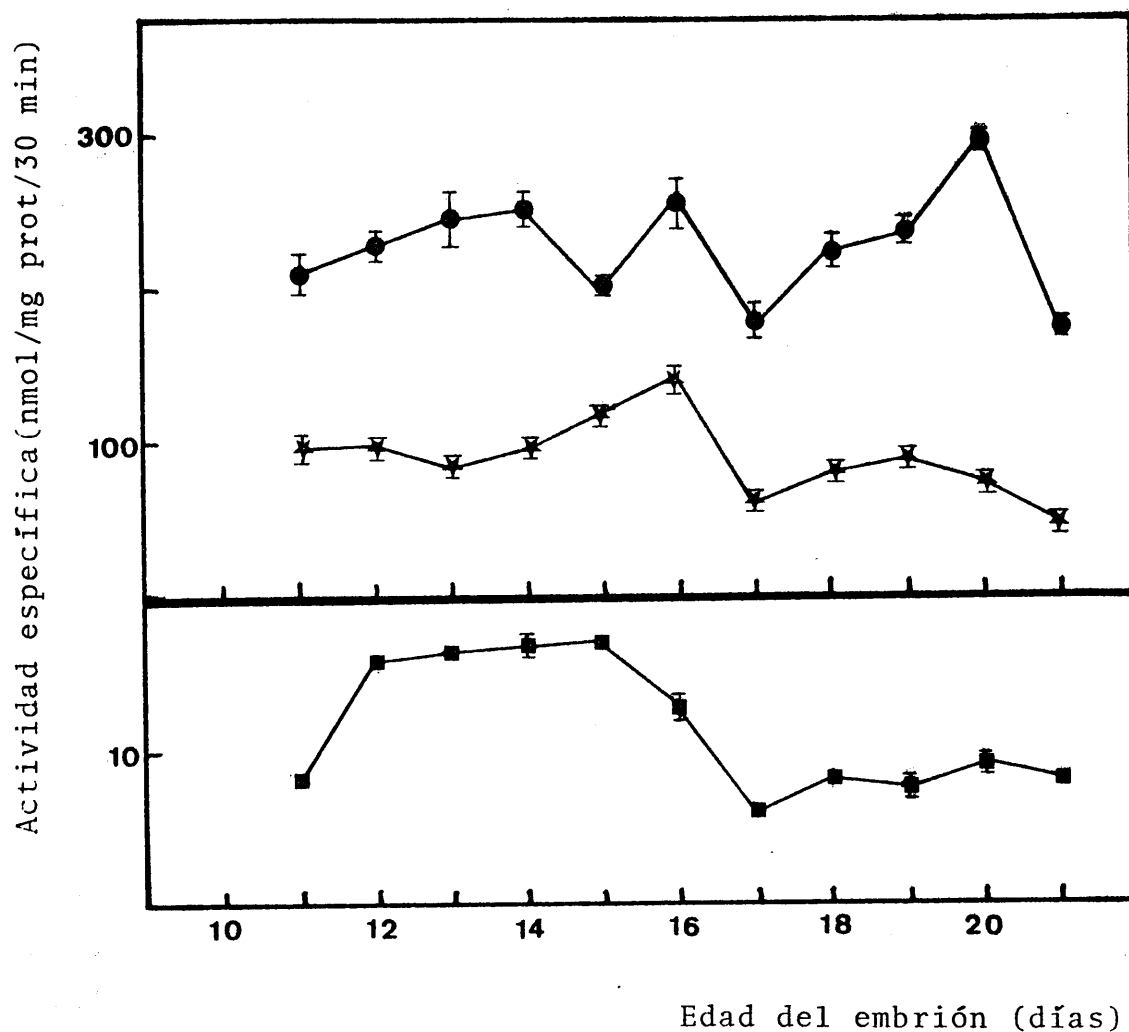


Fig. 14.- Variaciones en las actividades enzimáticas: mevalonato cinasa (●), fosfomevalonato cinasa (★) y pirofosfomevalonato descarboxilasa (■) en riñón de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos tres experiencias \pm S.E.M.

4. C.- INCORPORACION DE 2-¹⁴C-MVA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION

Con objeto de comprobar la capacidad de utilización de ácido mevalónico (uno de los precursores colesterogénicos mas comúnmente empleados) por los distintos órganos embrionarios, se ha realizado la medida de la velocidad de incorporación de este sustrato tanto a lípidos insaponificables como a CO₂ desprendido como consecuencia del "shunt" del MVA durante el período embrionario.

4. C. 1. - INCORPORACION VIA "SHUNT"

Se ha efectuado la determinación del ¹⁴CO₂ desprendido como consecuencia del "shunt" a partir de MVA en cerebro, hígado, intestino y riñón de embrión de pollo. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla XV en la que se observa que la formación de ¹⁴CO₂ debida al "shunt" del MVA es prácticamente nula en el cerebro y en el hígado.

Sin embargo, en intestino y riñón (tabla XV, fig. 15), el CO₂ debido al "shunt" del MVA es considerable y en ambos órganos el perfil de la curva obtenida es semejante, siendo los niveles un tanto superiores en el caso del intestino.

4. C. 2. - INCORPORACION A LIPIDOS INSAPONIFICABLES

Se ha estudiado a lo largo del desarrollo la velocidad de incorporación del MVA en lípidos insaponificables to tales, así como la determinación de la incorporación a distintos compuestos isoprenoides insaponificables sintetizados a partir del sustrato en cerebro, hígado, intestino y riñón de embrión de pollo.

TABLA XV

Cambios en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ como consecuencia del "shunt" en cerebro, hígado, intestino y riñón embrionarios. Los resultados son media de cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media. (nd = no detectado)

Edad del embrión (días)	$^{14}\text{CO}_2$ desprendido (nmoles/g/h)			
	Cerebro	Hígado	Intestino	Riñón
10	nd	nd	25.97 ± 1.25	----
11	--	--	----	18.11 ± 1.95
12	nd	nd	17.50 ± 1.52	----
14	nd	nd	15.13 ± 1.49	11.74 ± 0.92
16	nd	nd	15.24 ± 0.98	13.47 ± 1.24
19	nd	nd	22.41 ± 2.01	17.13 ± 1.68
21	nd	nd	12.61 ± 1.42	10.45 ± 1.05

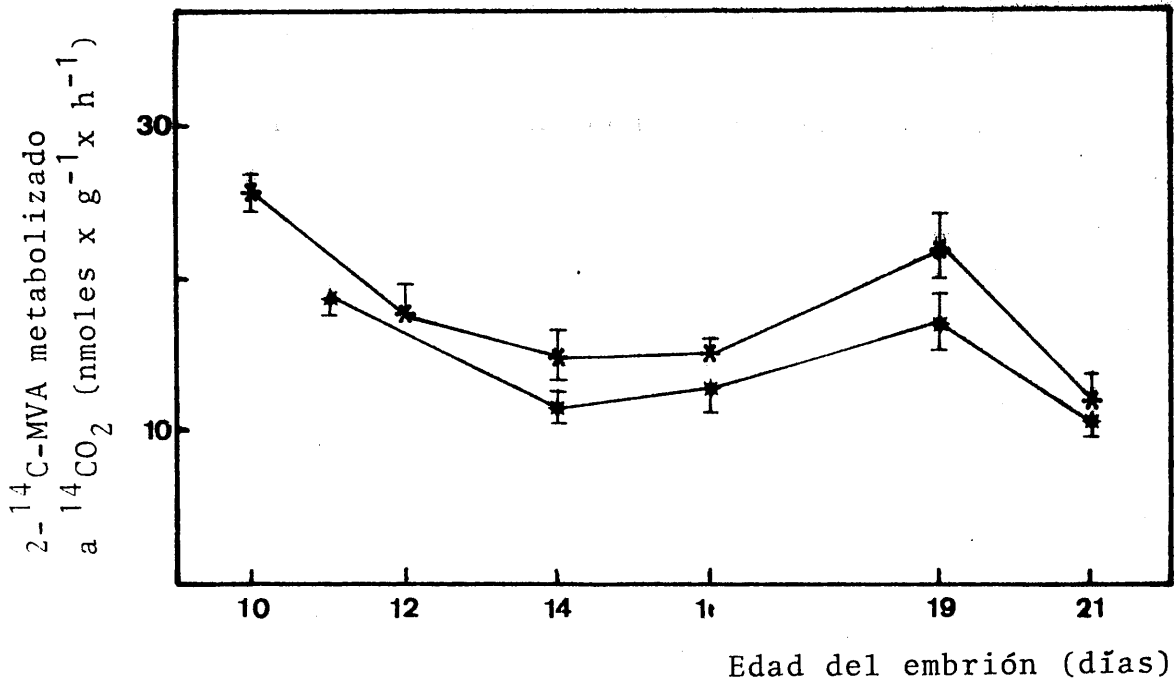


Fig. 15.- Cambios en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ como consecuencia del "shunt" en intestino (*) y riñón (•) de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M.

4. C. 2. 1. - Incorporación en cerebro

En la tabla XVI (fig. 16) Se han representado los cambios en la velocidad de incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. La tasa de incorporación es bastante elevada y poco variable entre los días 10 y 19 de desarrollo embrionario, momento a partir del que disminuye hasta alcanzar niveles inferiores el día 2 tras la eclosión.

Durante el período de desarrollo estudiado el cerebro de pollo muestra un incremento acusado en el peso y una disminución en el contenido de agua. En algunos casos (como, presumiblemente en el proceso de mielinización) los cambios en las tasas de síntesis y niveles enzimáticos pueden ser el resultado de una regulación intracelular y por ello independientes del patrón de crecimiento del órgano. Los valores referidos al cerebro completo son independientes de cambios importantes en el peso. Por estas razones en la tabla XVI (fig. 17) se ha expresado así mismo la velocidad de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en el cerebro completo. Mediante esta forma de expresión se observa claramente un gran aumento en la capacidad de utilización del MVA desde el día 10 al 19 para disminuir más tarde hasta el día 2 de vida postnatal.

Cuando se observan las variaciones en la cantidad de sustrato incorporado a cada uno de los lípidos insaponificables medidos (tabla XVII, fig. 18) se aprecia que mientras que los niveles de colesterol, lanosterol y demosterol disminuyen de forma clara a partir del día 16, la radiactividad incorporada a un compuesto no identificado que se observa en todos los casos aumentan de forma acusada durante el mismo período.

TABLA XVI

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en cerebro de embrión de pollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media. El día +2 se refiere al día segundo después de la eclosión.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables totales	
	nmoles / h / g incorporados	nmoles / h / cerebro incorporados
10	22.231 ± 0.582	2.938 ± 0.077
12	26.293 ± 0.683	6.402 ± 0.166
14	24.115 ± 0.951	10.166 ± 0.076
16	27.424 ± 1.114	14.123 ± 0.574
19	24.848 ± 1.342	18.188 ± 0.982
21	20.005 ± 0.764	17.175 ± 0.596
+2	17.226 ± 1.539	

to. Mediante esta forma de expresión se observa claramente un gran aumento en la cantidad de utilización del MVA desde el día 10 al 19 para disminuir más tarde hasta el día 2 de vida postnatal.

Cuando se observan las variaciones en la cantidad de sustrato incorporado a cada uno de los lípidos insaponificables medidos (Tabla XVII, fig. 18) se aprecia que mientras que los niveles de colesterol, lanosterol y demosterol disminuyen de forma clara a partir del día 10, la radiactividad incorporada a un compuesto no identificado que se observa en todos los casos aumenta de forma acusada durante el mismo período.

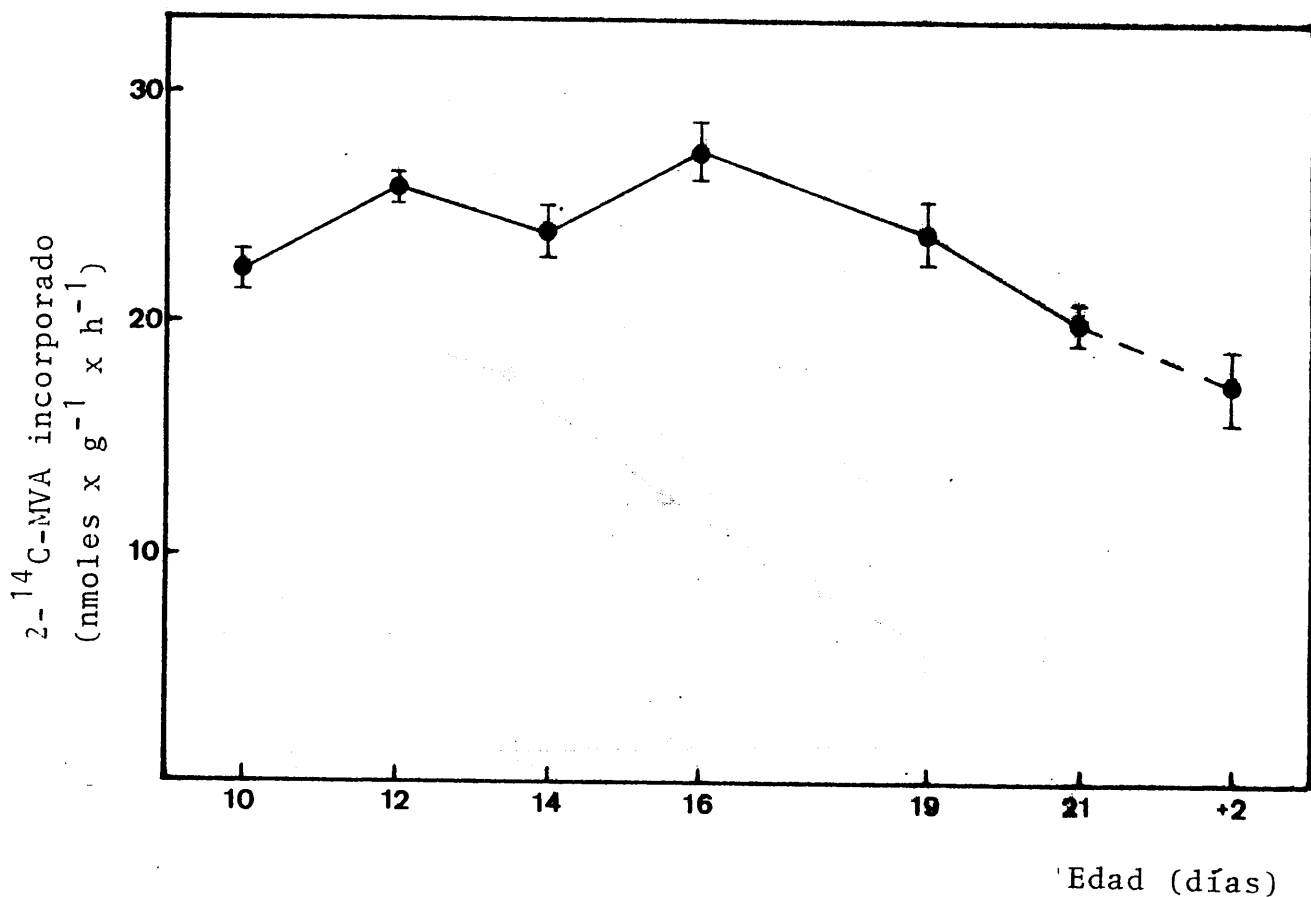


Fig. 16.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo durante el período perinatal. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por gramo y por hora. Los valores son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del S.E.M. La línea discontinua representa días tras la eclosión.

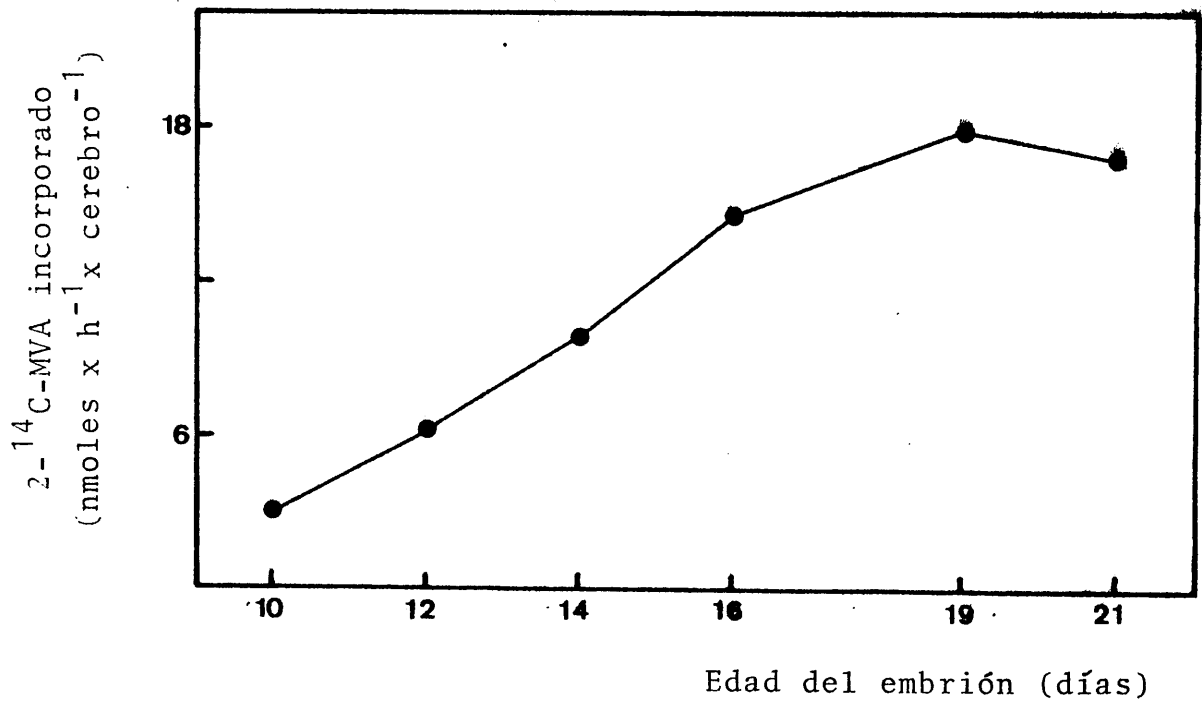


Fig. 17.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como nmol incorporados por hora en un cerebro completo.

TABLA XVII

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (nmoles/g /h)				
	Escualeno	Lanosterol	Colesterol	Desmosterol	Desconocido
10	1.28 ± 0.24	6.79 ± 0.97	5.20 ± 0.21	3.00 ± 0.12	5.96 ± 0.38
12	0.47 ± 0.12	8.96 ± 0.57	5.79 ± 0.28	3.27 ± 0.24	7.83 ± 0.26
14	0.60 ± 0.12	8.10 ± 0.58	5.39 ± 0.55	2.73 ± 0.11	7.29 ± 1.01
16	0.41 ± 0.06	8.84 ± 1.29	6.69 ± 0.61	3.65 ± 0.18	7.84 ± 0.86
19	0.33 ± 0.05	8.45 ± 0.58	4.73 ± 0.27	2.19 ± 0.19	9.14 ± 0.65
21	0.38 ± 0.03	5.39 ± 0.53	4.14 ± 0.41	1.66 ± 0.20	10.45 ± 0.54
+2	0.47 ± 0.06	2.13 ± 0.22	3.32 ± 0.34	1.15 ± 0.14	8.73 ± 0.85

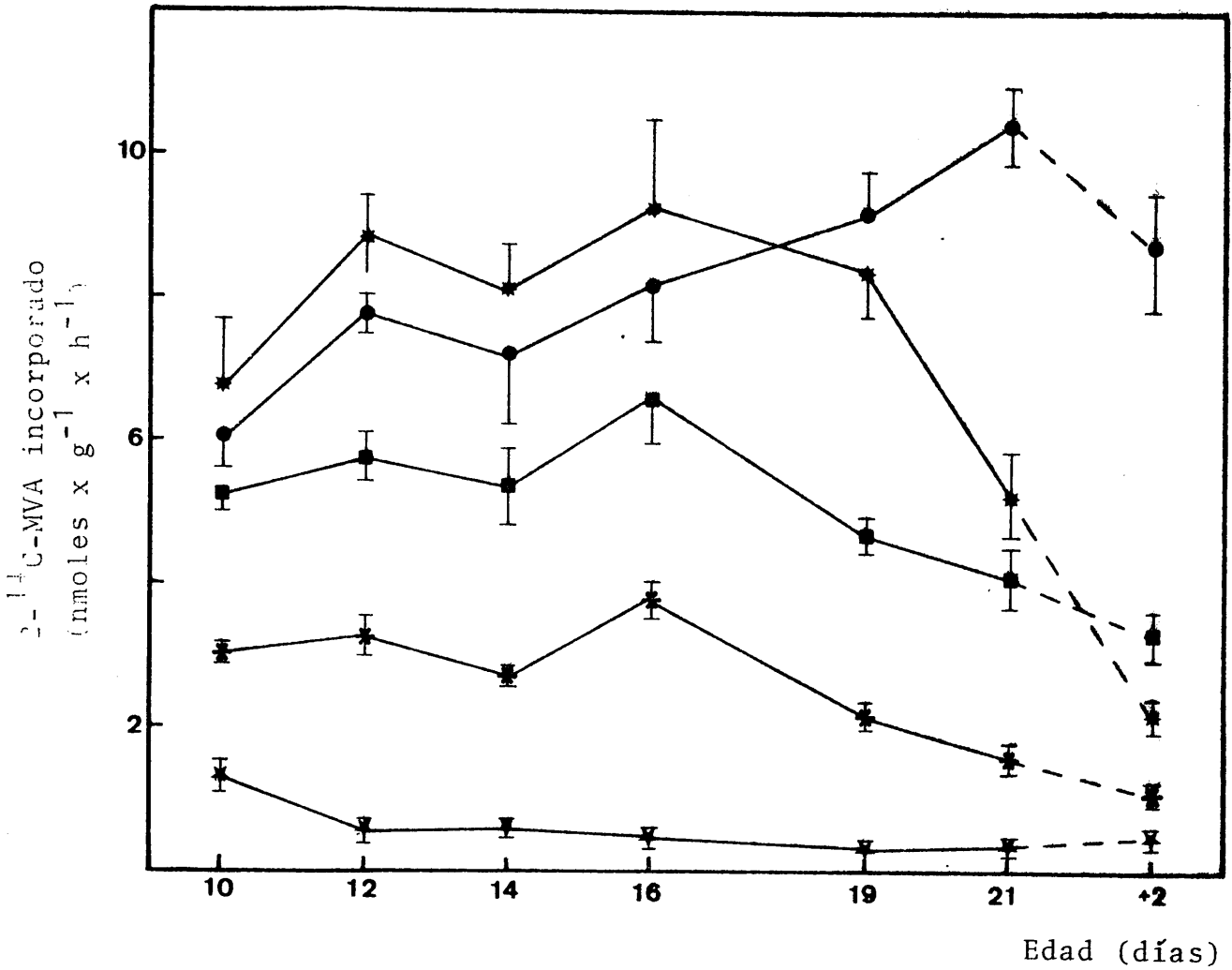


Fig. 18.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (*) lanosterol; (■) colesterol; (▼) desmosterol; (●) no identificado.

En la tabla XVIII (fig. 19) aparecen indicados los porcentajes relativos de incorporación desde el sustrato a distintos lípidos insaponificables. El lanosterol, colesterol y el compuesto no identificado se hallan en porcentajes próximos al 25%. A partir del día 16 se observa un notable aumento en el porcentaje de incorporación al compuesto no identificado, aumento que va acompañado de una disminución en el lanosterol. La incorporación a desmosterol disminuye también desde un 13 a un 7% dos días tras la eclosión.

4. C. 2. 2. - Incorporación en hígado

La tasa de incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales en el hígado ha resultado ser muy elevada los primeros días de estudio, para disminuir de forma muy patente desde el día 12 de desarrollo embrionario hasta 2 días tras la eclosión (tabla XIX, fig. 20). Cuando la incorporación se expresa como nmoles de sustrato incorporado por hora en el hígado completo (tabla XIX, fig. 21) la incorporación aumenta, por el contrario, claramente durante el período embrionario.

En cuanto a la incorporación de MVA a los distintos lípidos insaponificables, los resultados se expresan en la tabla XX (fig. 22) . La incorporación a colesterol aumenta entre los días 10 y 12 para disminuir a partir de este momento bruscamente hasta el día 14 manteniéndose durante el resto del período estudiado en niveles muy bajos. También los niveles de incorporación a escualeno disminuyen de forma notable desde el día 14. Sorprendentemente la tasa de incorporación de MVA a ubiquinona muestra un aumento muy acusado desde el día 10 al 19 de desarrollo embrionario descendiendo a partir de este momento.

TABLA XVIII

Variación en el porcentaje de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Lanosterol	Colesterol	Desmosterol	Desconocido
10	5.77 ± 1.08	30.54 ± 4.39	23.40 ± 0.72	13.47 ± 0.58	26.81 ± 1.54
12	1.70 ± 0.47	34.07 ± 1.99	22.02 ± 0.88	12.43 ± 0.86	29.78 ± 0.63
14	2.50 ± 0.50	33.57 ± 2.20	22.37 ± 2.14	11.32 ± 0.14	30.24 ± 3.91
16	1.51 ± 0.23	32.22 ± 4.53	24.39 ± 1.91	13.29 ± 0.40	28.59 ± 2.99
19	1.34 ± 0.20	34.02 ± 1.44	19.04 ± 0.40	8.80 ± 0.61	36.74 ± 1.73
21	1.74 ± 0.15	24.48 ± 2.47	18.79 ± 0.20	7.56 ± 0.67	47.47 ± 2.02
+2	2.99 ± 0.21	13.48 ± 0.37	21.00 ± 0.54	7.28 ± 0.19	55.27 ± 0.47

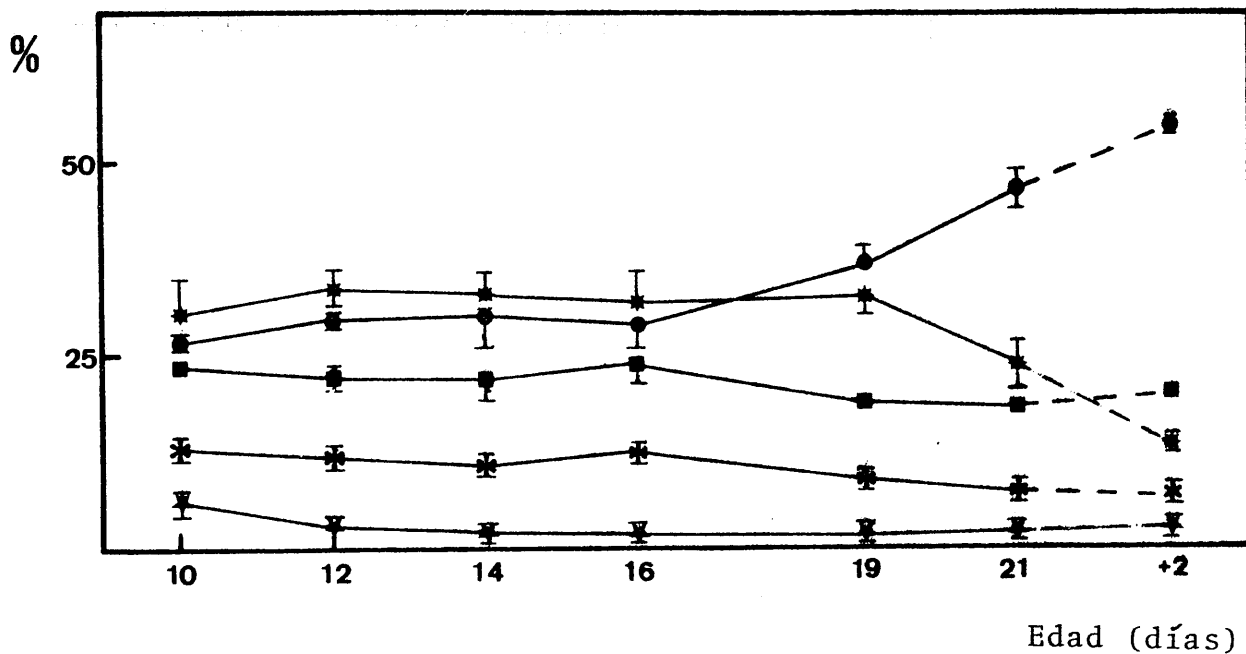


Fig. 19.- Cambios en el porcentaje de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el período perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (✱) lanosterol; (■) colesterol; (✖) desmosterol; (●) no identificado.

TABLA XIX

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media. El día +2 se refiere al día segundo después de la eclosión.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables	
	nmoles / g /h	nmoles / h /cerebro
10	72.07 ± 1.44	2.82 ± 0.05
12	87.78 ± 6.08	7.64 ± 0.53
14	59.71 ± 3.66	12.24 ± 0.75
16	53.33 ± 2.49	15.04 ± 0.70
19	47.45 ± 2.35	23.87 ± 1.18
21	38.02 ± 0.59	24.52 ± 0.38
+2	24.51 ± 1.19	----

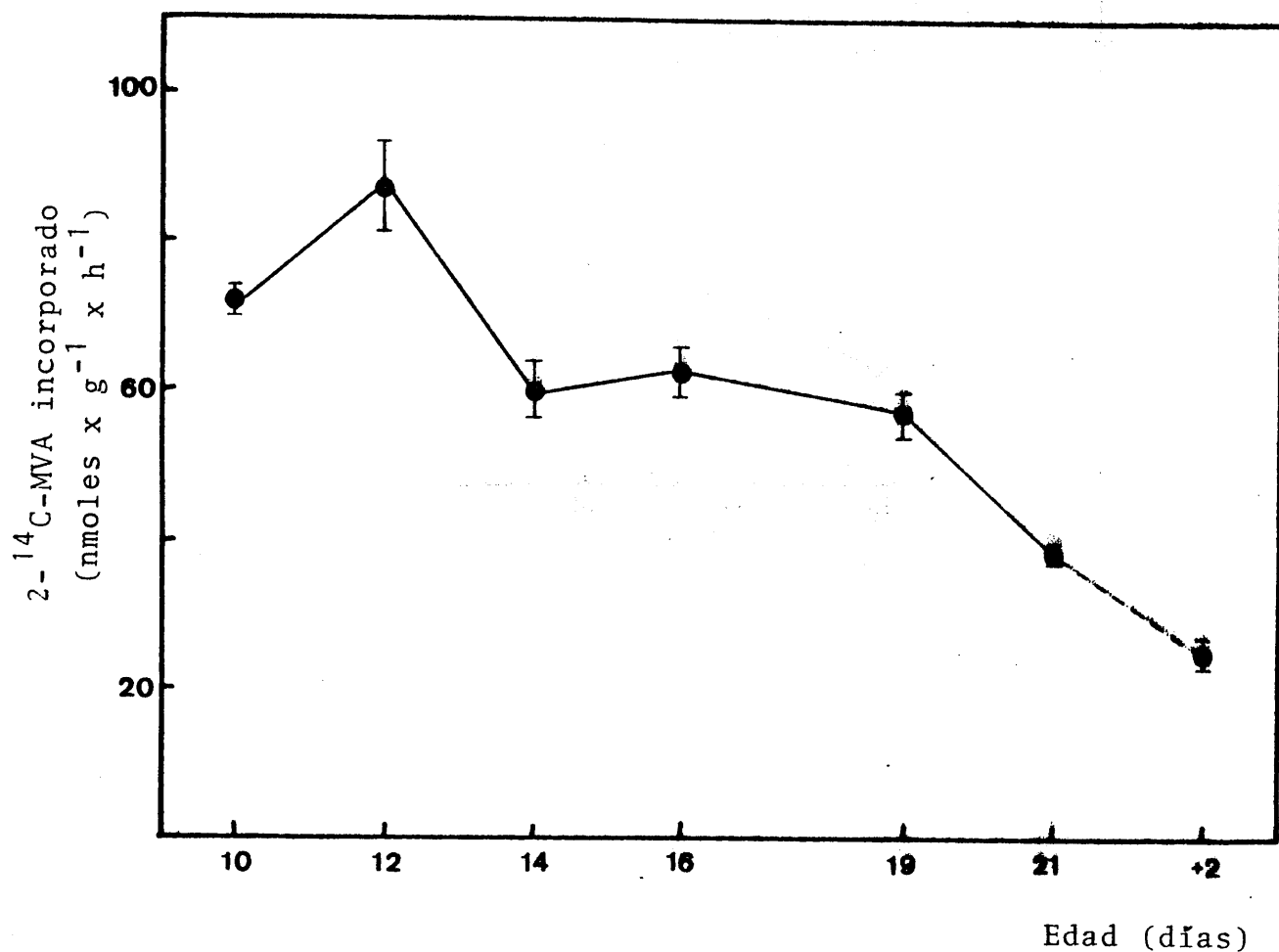


Fig. 20.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en hígado de pollo durante el período perinatal. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por gramo y por hora. Los valores son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del S.E.M. La línea discontinua representa días tras la eclosión.

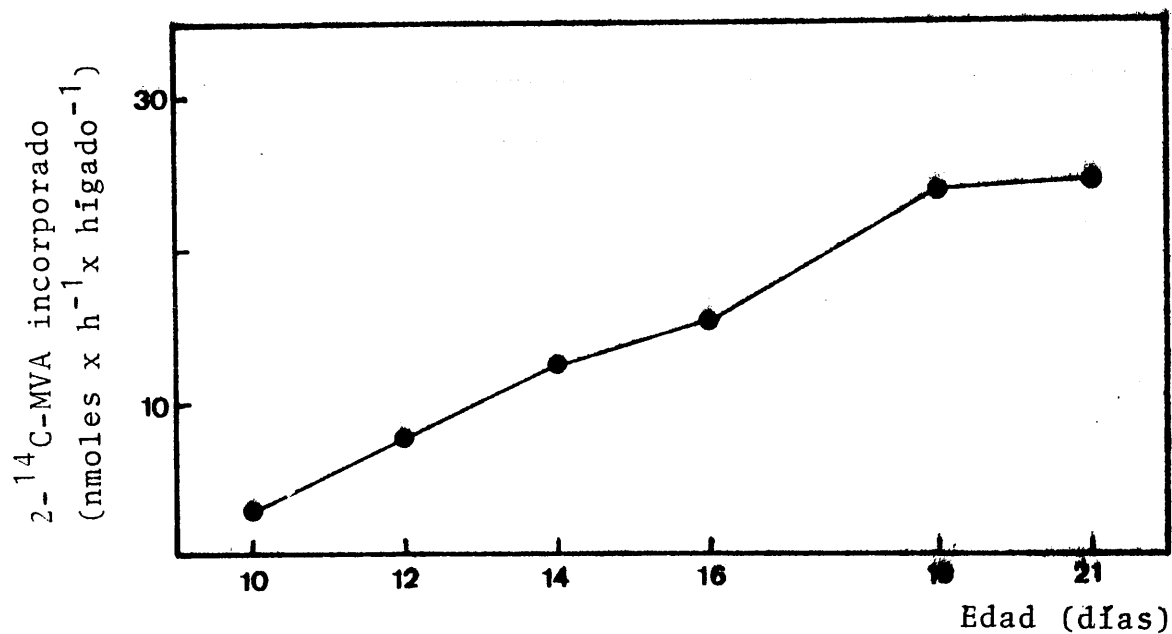


Fig. 21.- Cambios en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en hígado de pollo durante el período embrionario. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por hora por el hígado completo.

TABLA XX

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (nmol / g / h)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	22.46 ± 1.98	7.76 ± 0.77	6.22 ± 0.53	26.50 ± 3.01	7.66 ± 1.34
12	22.34 ± 2.90	9.03 ± 1.79	9.41 ± 1.24	41.59 ± 5.15	5.41 ± 0.77
14	23.57 ± 2.59	14.31 ± 2.13	7.68 ± 0.61	7.20 ± 0.90	6.94 ± 1.75
16	12.58 ± 1.56	26.50 ± 3.17	7.98 ± 0.96	3.82 ± 0.50	2.46 ± 0.16
19	10.89 ± 2.21	27.99 ± 3.16	5.49 ± 0.59	1.73 ± 0.35	1.38 ± 0.14
21	5.03 ± 0.99	17.83 ± 1.55	4.98 ± 0.57	2.49 ± 0.15	5.13 ± 1.01
+2	2.35 ± 0.32	12.23 ± 1.41	4.57 ± 0.44	2.60 ± 0.42	1.58 ± 0.16

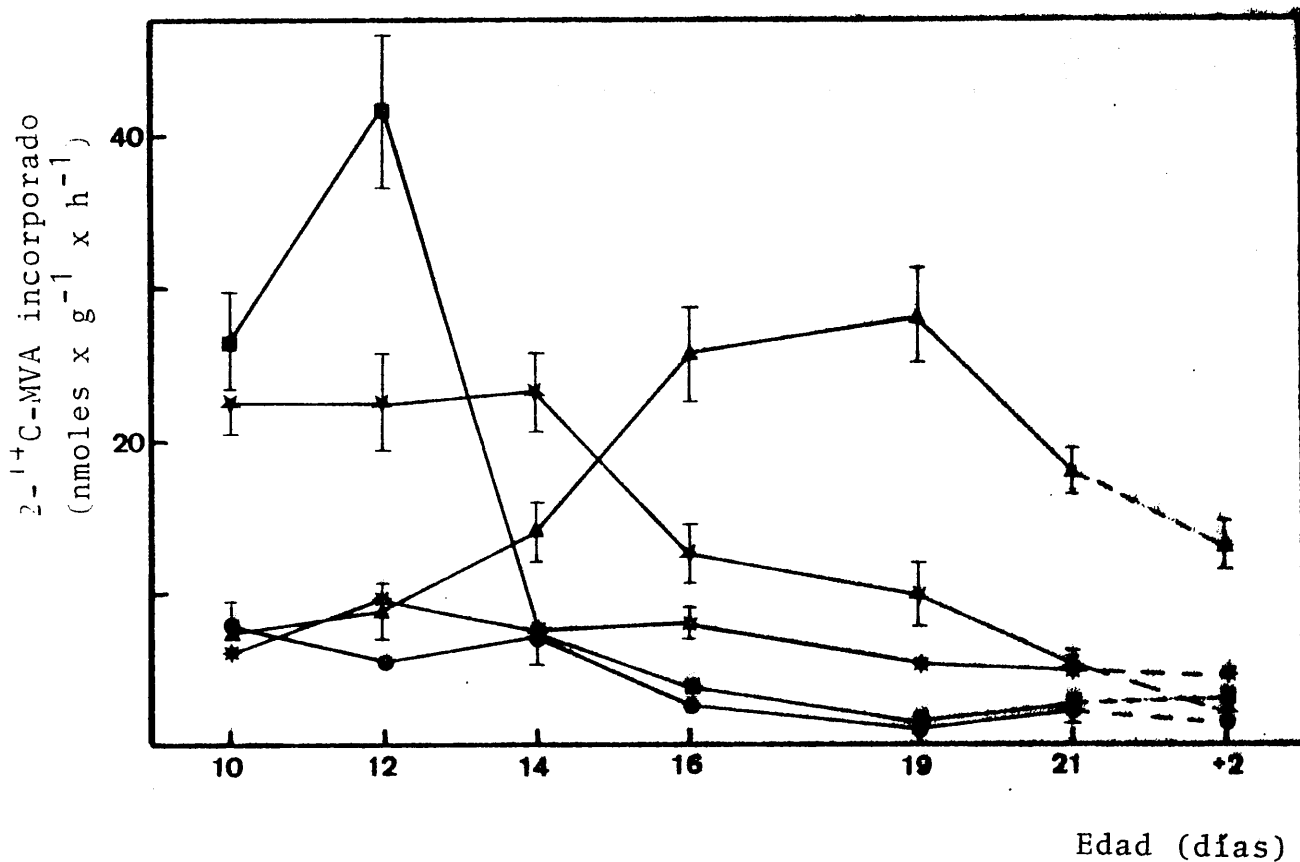


Fig. 22.- Variación en la incorporación de $2-^{14}\text{C}$ -MVA a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (✱) escualeno; (▲) ubiquinona; (★) lanosterol; (■) colecsterol; (●) no identificado.

Algo semejante se observa al representar los porcentajes relativos de incorporación a cada uno de los lípidos insaponificables (tabla XXI, fig. 23). El porcentaje de radiactividad incorporada a colesterol experimenta un brusco aumento entre los días 10-12 descendiendo más tarde a niveles muy inferiores mientras que la incorporación a ubiquinona aumenta marcadamente alcanzándose niveles del orden del 50% a partir del día 16. El % de incorporación a escualeno se mantiene en niveles bastante superiores a los observados para el lanosterol y el compuesto desconocido.

4. C. 2. 3.- Incorporación en intestino

La incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales en intestino aparece expresada en la tabla XXII (fig. 24). En este órgano la velocidad de incorporación aumenta de forma acusada desde el día 10 al 19 de desarrollo embrionario y desciende hasta valores muy inferiores el día 21. Dada la dificultad que entraña el totalizar el órgano completo, puesto que la porción final de éste está íntimamente unida al aparato genital, en este caso no se ha expresado la incorporación observada en el órgano completo. La incorporación de MVA a los distintos lípidos insaponificables (tabla XXII y fig. 25) aumenta igualmente durante el mismo período. El aumento más acusado se ha observado en el compuesto no identificado de tal forma que en el día 21 es el que se halla en niveles muy superiores al resto.

En cuanto a los porcentajes relativos de incorporación de MVA a los distintos lípidos insaponificables (tabla XXIII y fig. 26) no se observan grandes variaciones en la incorporación a lanosterol, escualeno y ubiquinona, que se mantienen en límites inferiores al 25%. El colesterol sin embargo

TABLA XXI

Variación en el porcentaje de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	31.17 ± 2.68	10.77 ± 1.04	8.63 ± 0.72	36.77 ± 4.11	10.63 ± 1.42
12	25.45 ± 2.79	10.29 ± 1.91	10.72 ± 1.20	47.38 ± 4.87	6.16 ± 0.77
14	39.48 ± 3.96	23.96 ± 3.39	12.86 ± 0.84	12.06 ± 1.41	11.63 ± 2.88
16	23.59 ± 2.72	49.69 ± 5.93	14.96 ± 1.79	7.16 ± 0.94	4.61 ± 0.29
19	22.95 ± 4.52	58.98 ± 5.99	11.58 ± 1.10	3.65 ± 0.71	2.90 ± 0.26
21	13.22 ± 2.60	46.90 ± 4.01	13.09 ± 1.48	7.49 ± 0.38	13.50 ± 2.64
+2	10.33 ± 1.21	53.98 ± 5.13	18.65 ± 1.53	10.60 ± 1.62	6.45 ± 0.56

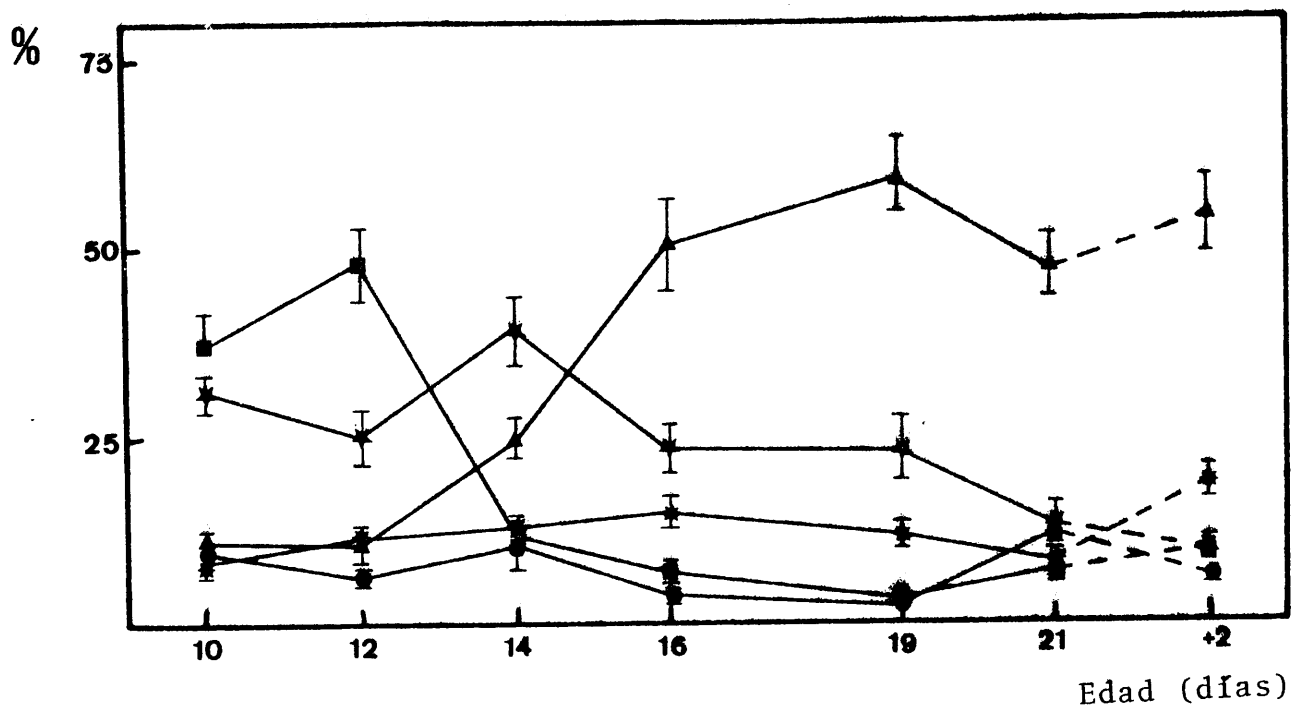


Fig. 23.- Cambios en el porcentaje de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el período perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (▲) ubiquinona; (✱) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado.

TABLA XXII

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en intestino de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (nmoles/g/h)					
	Totales	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	3.88 ± 0.11	0.387 ± 0.09	0.553 ± 0.07	0.804 ± 0.09	1.366 ± 0.13	0.77 ± 0.12
12	14.50 ± 1.01	1.163 ± 0.15	0.870 ± 0.09	2.175 ± 0.22	4.803 ± 0.48	5.49 ± 0.57
14	16.60 ± 1.14	1.821 ± 0.15	1.198 ± 0.11	3.151 ± 0.49	5.699 ± 0.38	5.73 ± 0.78
16	27.24 ± 1.82	4.085 ± 0.49	2.860 ± 0.31	4.758 ± 0.46	6.264 ± 0.70	9.27 ± 1.01
19	35.52 ± 3.59	8.411 ± 1.07	5.452 ± 0.72	5.943 ± 0.70	5.378 ± 0.30	10.34 ± 1.08
21	13.85 ± 1.01	0.425 ± 0.03	0.796 ± 0.07	1.767 ± 0.24	2.459 ± 0.25	8.40 ± 0.64

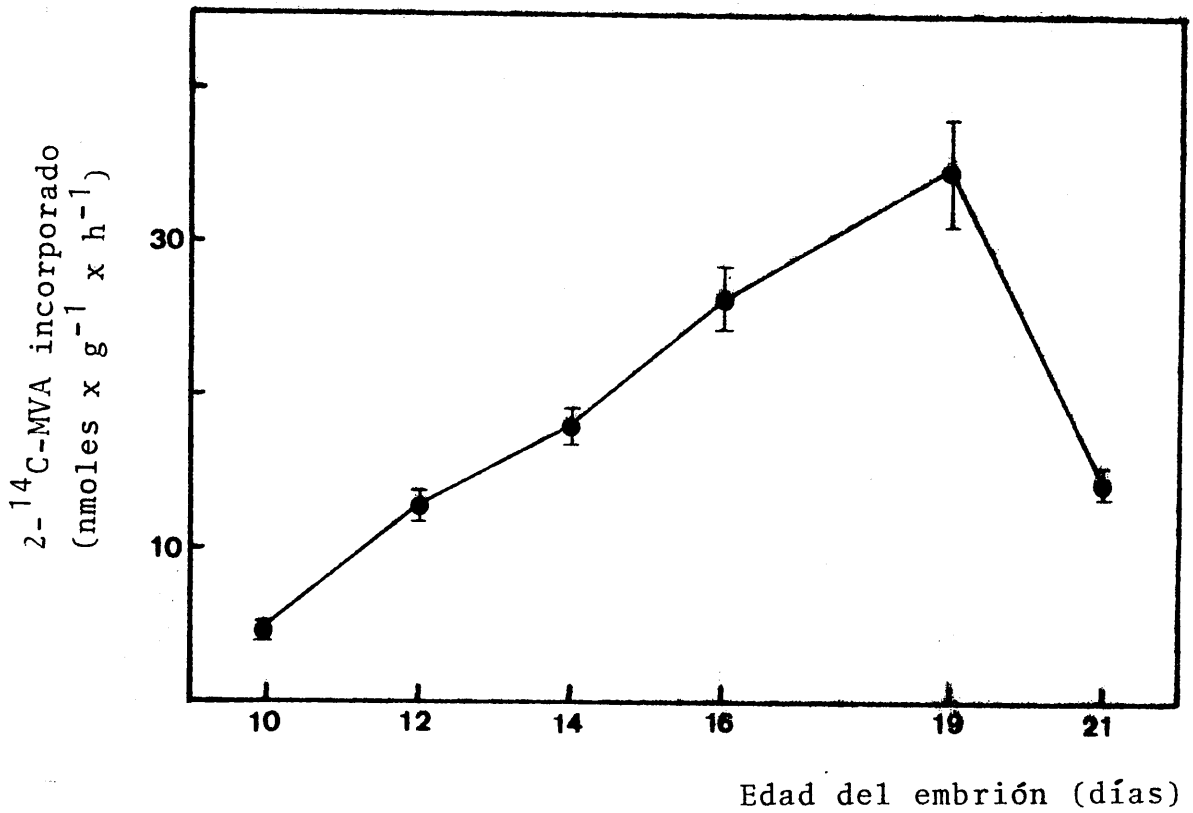


Fig.24.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en intestino de embrión de pollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar.

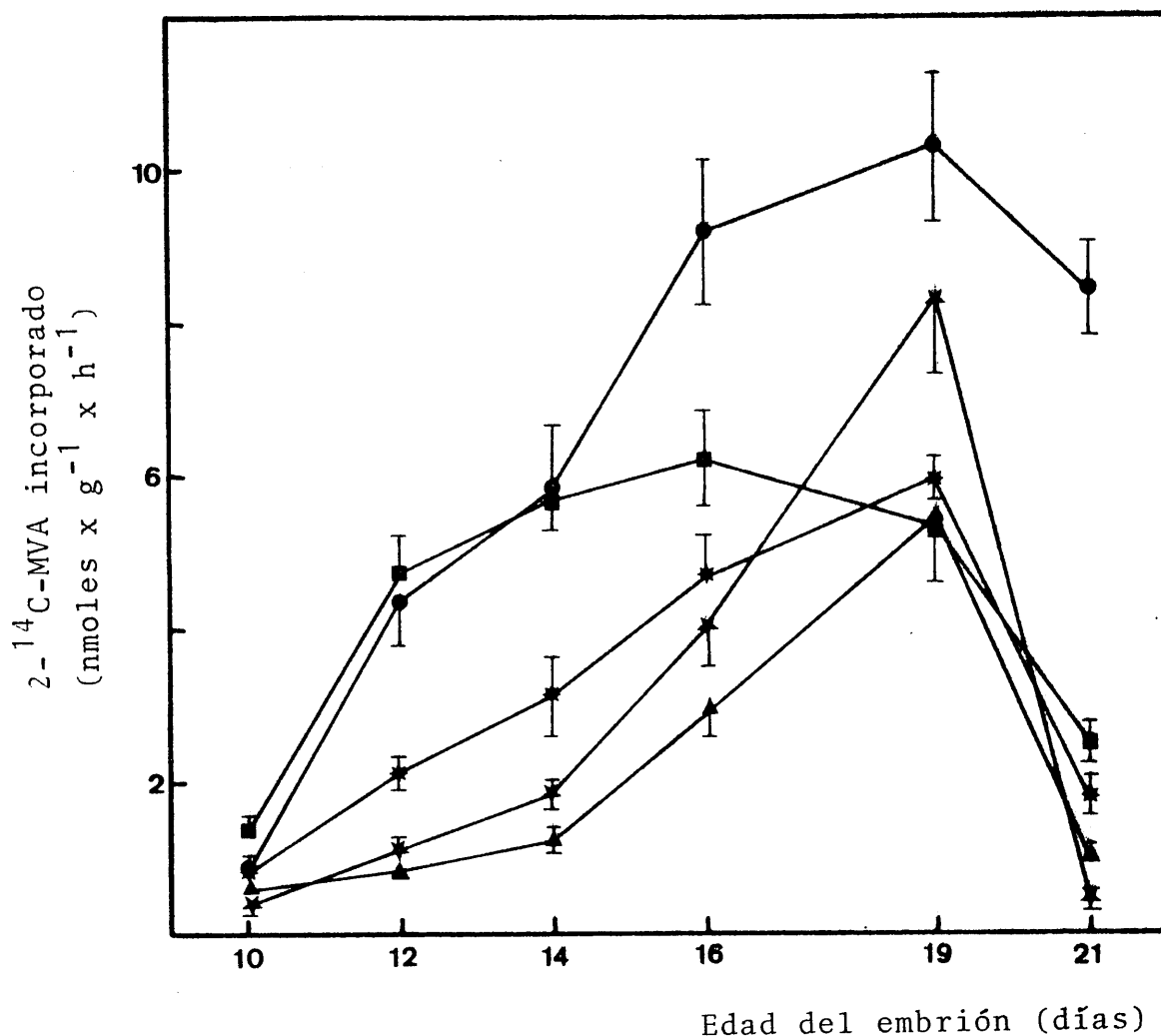


Fig. 25.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en intestino de pollo a lo largo del desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (▲) ubiquinona; (*) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado

TABLA XXIII

Variación en el porcentaje de incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en intestino de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	9.96 ± 2.42	14.25 ± 1.81	20.60 ± 2.25	35.19 ± 3.19	19.88 ± 2.93
12	8.02 ± 0.90	6.00 ± 0.48	15.00 ± 1.12	33.13 ± 2.41	37.85 ± 2.95
14	10.36 ± 0.54	6.91 ± 0.48	17.91 ± 2.53	32.39 ± 0.44	32.56 ± 3.91
16	15.01 ± 1.50	10.50 ± 0.91	17.47 ± 1.24	22.99 ± 2.01	34.03 ± 2.97
19	23.68 ± 3.70	15.35 ± 1.28	16.73 ± 1.00	15.14 ± 0.70	29.11 ± 0.73
21	3.07 ± 0.22	5.75 ± 0.27	12.76 ± 1.48	17.76 ± 1.23	60.66 ± 1.27

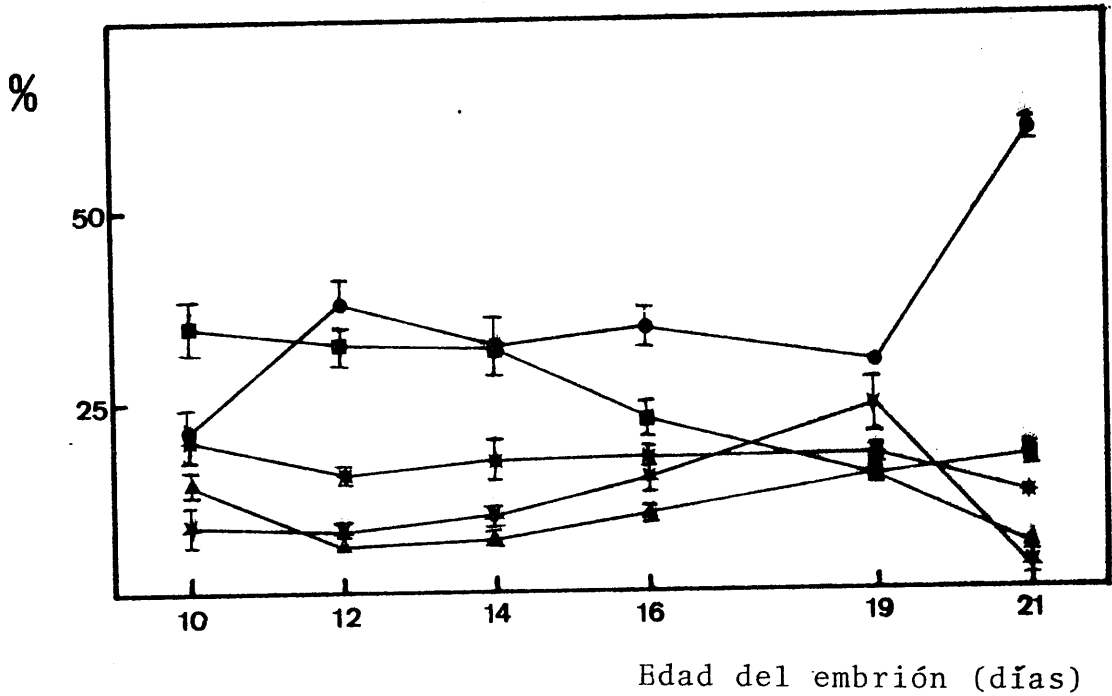


Fig. 26.- Cambios en el porcentaje de incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA a lípidos insaponificables en intestino de pollo durante el período perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (✱) esqualeno; (▲) ubiquinona; (*) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado.

disminuye un tanto mientras que el porcentaje de incorporación al compuesto desconocido aumenta de tal forma que el día 21 supone más del 60% de la radiactividad del MVA incorporada a insaponificables.

4. C. 2. 4. - Incorporación en riñón

Las variaciones en la velocidad de incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales en riñón de embrión de pollo se muestran en la tabla XXIV (fig. 27). En este órgano la velocidad de incorporación que aumenta del día 11 al 14 muestra, a partir de este momento, una disminución que continúa hasta el momento de la eclosión, alcanzado en este momento valores semejantes a los observados en intestino e inferiores a los existentes en cerebro e hígado. Cuando la incorporación se expresa como nmoles incorporados por hora por ambos riñones (tabla XXIVm fig. 28) se observa un aumento en la incorporación a lípidos insaponificables totales desde el día 11 al 16 de incubación. A partir de este momento los niveles se mantienen hasta el día 19, descendiendo más tarde en el momento de la eclosión.

Un patrón de desarrollo semejante se ha observado en el caso de la incorporación de MVA a colesterol, mientras que no se han observado cambios considerables en la incorporación de MVA a lanosterol, escualeno o ubiquinona que se mantienen en niveles muy inferiores. El compuesto desconocido, que entre los días 11-16 se mantenía en niveles bastante elevados, disminuye hacia el final del periodo de incubación (tabla XXV y fig. 29).

TABLA XXIV

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a distintos lípidos insaponificables en riñón de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables	
	nmoles/g /h	nmoles/h/riñón
11	26.52 ± 1.20	0.29 ± 0.01
14	44.90 ± 3.67	1.39 ± 0.11
16	32.13 ± 3.51	2.73 ± 0.30
19	20.43 ± 1.41	2.76 ± 0.19
21	10.14 ± 1.02	1.75 ± 0.18

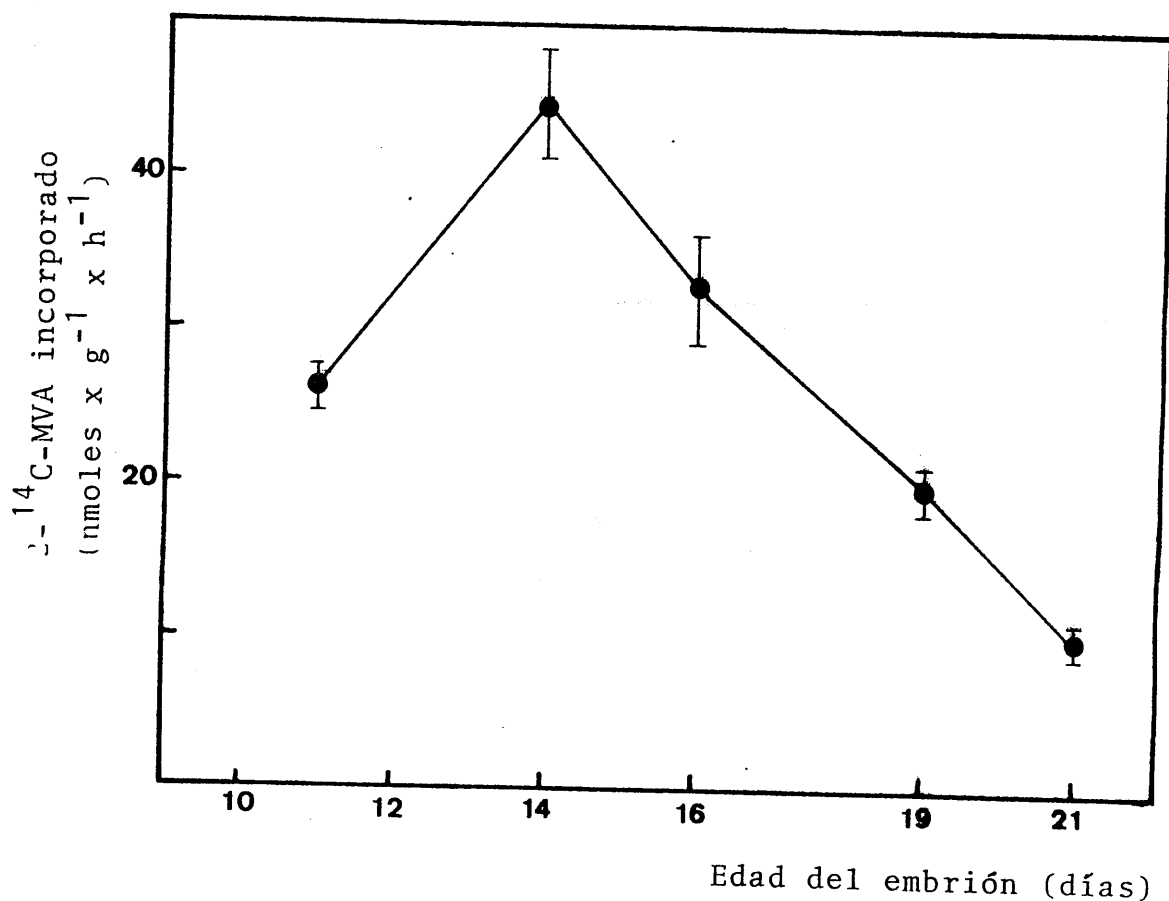
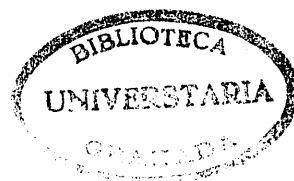


Fig. 27.- Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables en riñón de embrión de pollo durante el período embrionario. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por gramo y por hora. Los valores son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M.



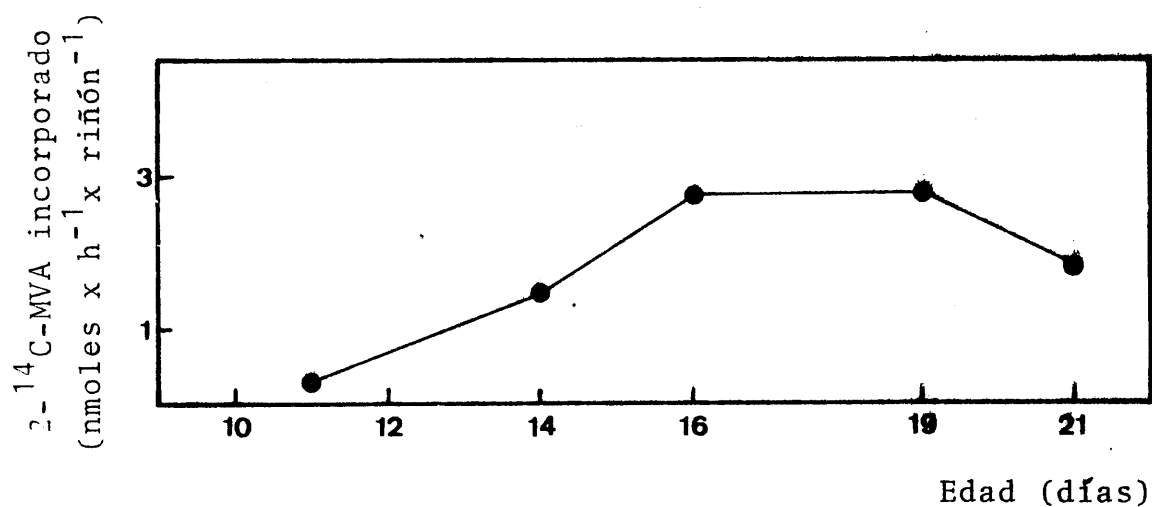


Fig. 28.- Cambios en la incorporación de $2-^{14}\text{C-MVA}$ a lípidos insaponificables totales en riñón de pollo durante el período embrionario. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por hora por ambos riñones.

TABLA XXV

Variación en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables totales en riñón de embrión de pollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (nmoles/g/h)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
11	0.814 ± 0.14	0.785 ± 0.09	2.358 ± 0.23	9.131 ± 0.81	13.430 ± 1.16
14	1.374 ± 0.30	1.544 ± 0.44	3.911 ± 0.91	25.102 ± 2.82	12.095 ± 1.60
16	0.936 ± 0.44	1.446 ± 0.56	3.364 ± 0.92	6.896 ± 0.90	13.808 ± 3.25
19	1.377 ± 0.20	2.286 ± 0.18	3.298 ± 0.35	3.945 ± 0.31	9.528 ± 0.89
21	1.377 ± 0.40	1.594 ± 0.18	2.287 ± 0.24	1.803 ± 0.18	3.082 ± 0.42

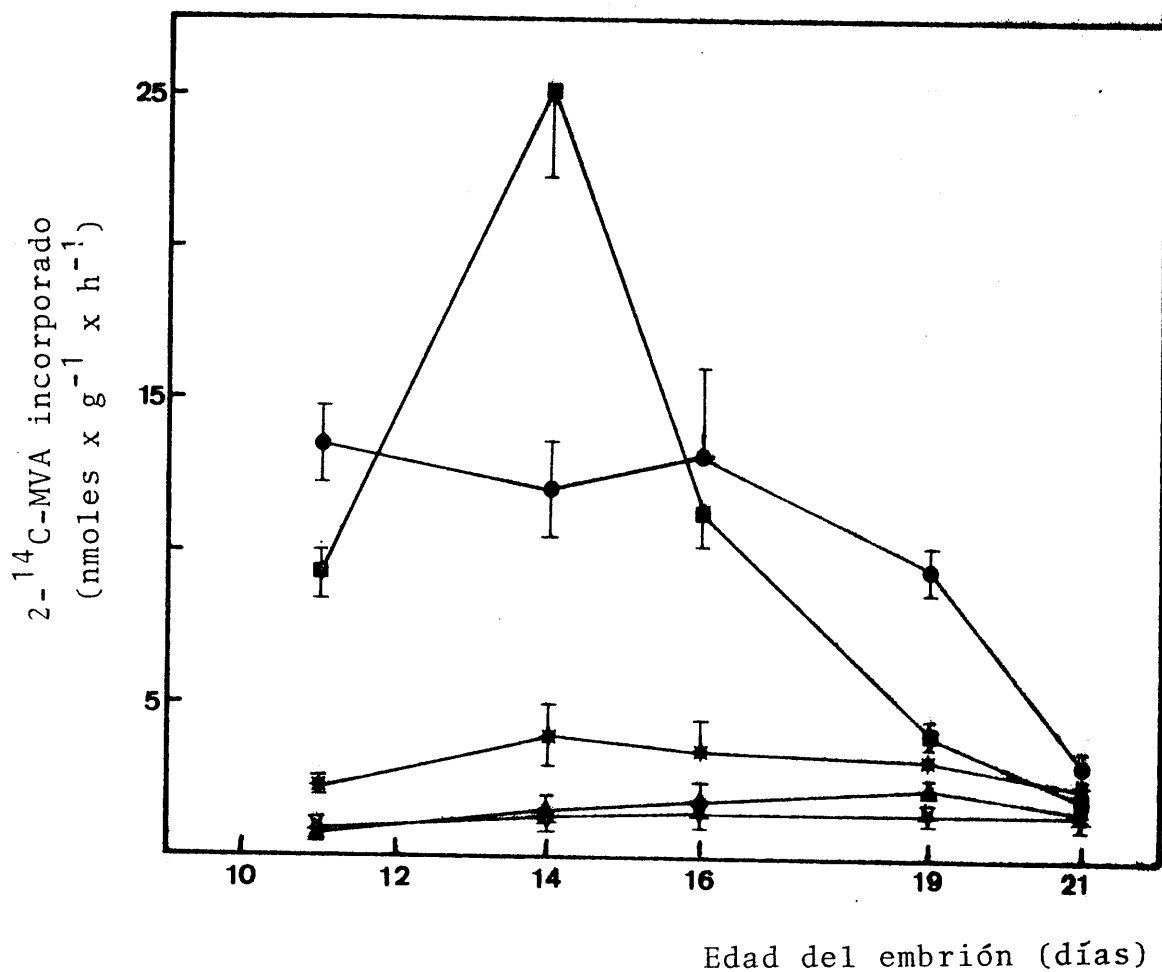


Fig. 29.- Variación en la incorporación de $2-^{14}\text{C-MVA}$ a distintos lípidos insaponificables en riñón de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (▲) ubiquinona; (*) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado.

TABLA XXVI

Variación en el porcentaje de incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ a distintos lípidos insaponificables en riñón de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
11	3.07 ± 0.51	2.96 ± 0.32	8.89 ± 0.78	34.43 ± 2.62	50.65 ± 3.74
14	3.06 ± 0.63	3.44 ± 0.93	6.71 ± 1.95	55.91 ± 4.32	26.94 ± 2.79
16	5.49 ± 1.63	6.10 ± 1.19	12.36 ± 2.55	25.33 ± 1.82	50.72 ± 4.73
19	6.74 ± 0.85	11.19 ± 0.47	16.14 ± 1.28	19.31 ± 0.70	46.63 ± 2.95
21	13.58 ± 1.36	15.72 ± 0.80	22.55 ± 0.62	17.78 ± 0.10	30.39 ± 2.86

En la tabla XXVI (fig. 30) se han representado los porcentajes relativos de incorporación de MVA a los distintos lípidos insaponificables. También en este caso el porcentaje de incorporación a colesterol aumenta del día 11 al 14 para disminuir posteriormente. El % de incorporación al compuesto no identificado presenta una variación inversa, disminuyendo entre el día 11 y 14 y aumentando más tarde hasta el día 19.

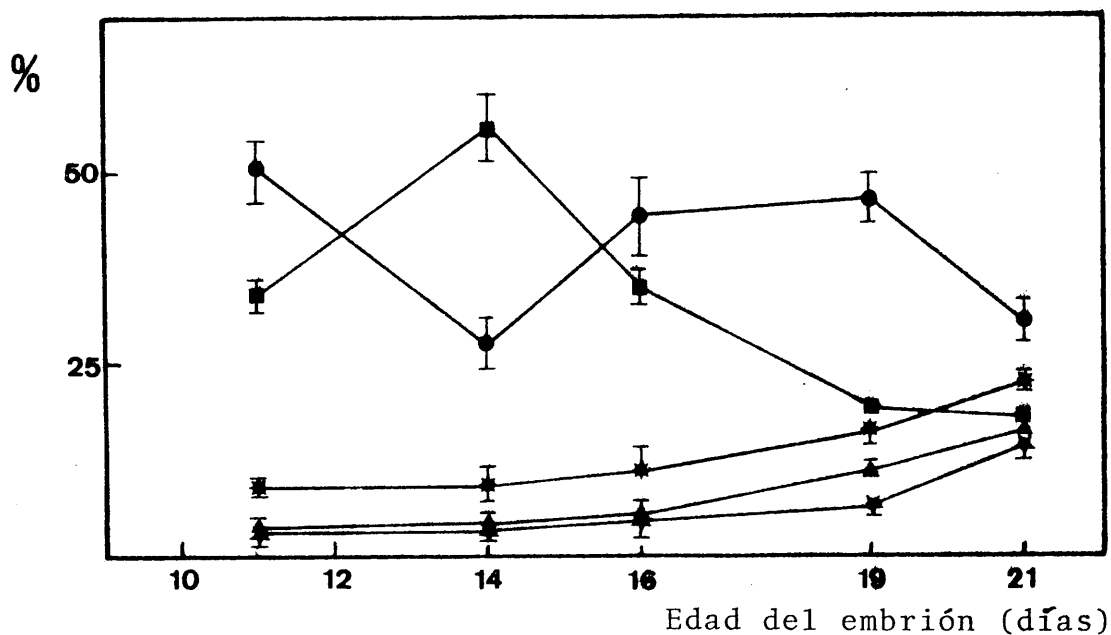


Fig. 30.- Cambios en el porcentaje de incorporación de $2-^{14}\text{C}$ -MVA a distintos lípidos insaponificables en riñón de embrión de pollo durante el desarrollo. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (✱) escualeno; (▲) ubiquinona; (*) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado.

4. D. - EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION

Debido al importante papel desempeñado por la HMG CoA reductasa como enzima clave en la regulación de la biosíntesis de colesterol en mamíferos y aves, hemos efectuado el estudio de la variación en la actividad reductasa en cerebro, hígado, intestino y riñón entre los 10 días de desarrollo embrionario y los 5 días posteriores a la eclosión. Como vemos, se ha realizado el estudio de la actividad reductasa también en los días 2 y 5 tras la eclosión con objeto de comparar los resultados de este estudio con trabajos efectuados anteriormente en nuestro Departamento durante el período postnatal.

Cada experiencia se ha realizado sobre embriones procedentes de una misma tanda de huevos incubados al mismo tiempo. Los animales se sacrificaban siempre a las 8 de la mañana, para evitar la interferencia debida a la existencia de un posible ritmo diurno en la actividad enzimática.

4. D. 1. - VARIACIONES EN CEREBRO

Se ha realizado la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa en cerebro de embrión de pollo a lo largo del desarrollo embrionario e inmediato a la eclosión.

En la tabla XXVII (fig. 32) se han representado los resultados obtenidos. Según se observa, cuando la actividad reductasa se expresa como $\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$, la actividad enzimática presenta niveles muy elevados a lo largo de todo el período estudiado. Aunque aparecen pequeñas fluctuaciones en la actividad no parece que esta varíe de forma acusada, man-

TABLA XXVII

Variación en la actividad HMG-CoA reductasa en cerebro de pollo durante el desarrollo embrionario e inmediato a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del error estándar de la media. Los días del desarrollo precedidos del signo + se refieren a días tras la eclosión.

Edad del embrión (días)	Actividad reductasa	
	pmoles/min/mg	pmoles/min/cerebro
8	669.60 ± 12.08	149.46 ± 2.70
10	781.60 ± 16.49	362.00 ± 7.64
12	622.50 ± 53.42	455.02 ± 39.05
14	648.53 ± 82.27	863.70 ± 109.57
16	525.75 ± 71.93	1084.63 ± 148.39
19	753.32 ± 37.74	2077.14 ± 104.06
21	554.88 ± 41.24	1656.15 ± 123.09
+2	592.70 ± 18.20	----
+5	635.60 ± 10.70	----

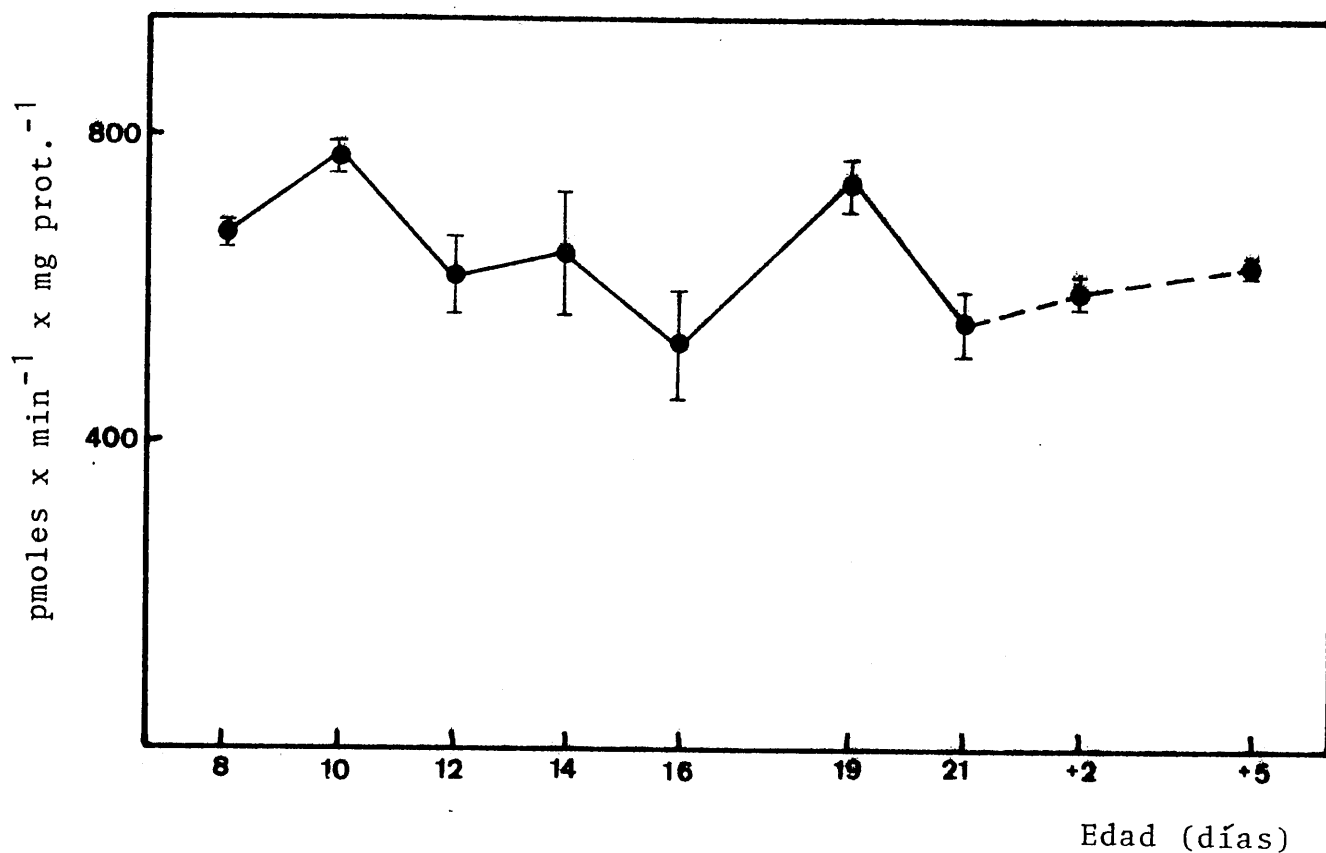


Fig. 31.- Variaciones de la actividad específica HMG-CoA reductasa de cerebro de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como pmoles de MVA formados por mg de proteína y por minuto. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del S.E.M.

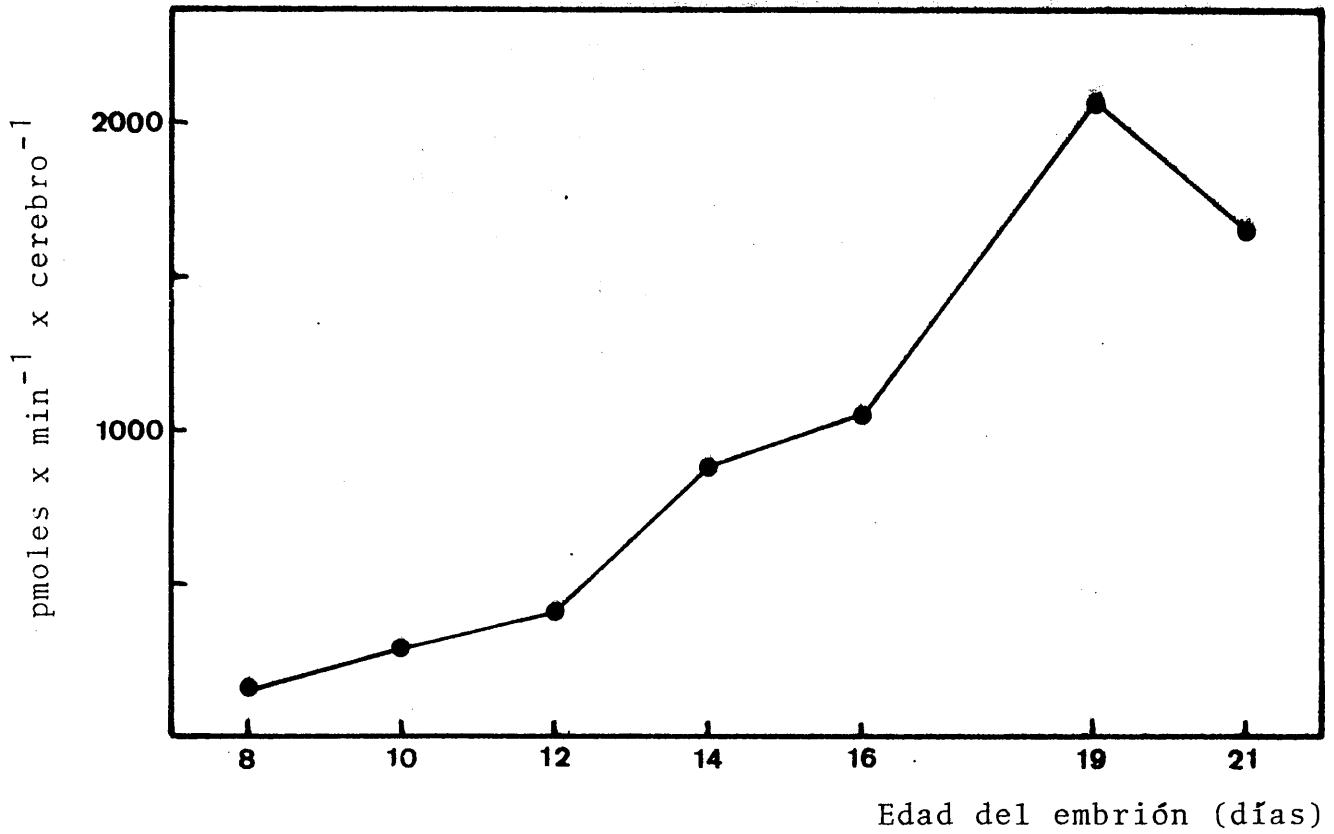


Fig. 32.- Variaciones, durante el desarrollo perinatal, de la actividad HMG-CoA reductasa expresada como pmoles de MVA formado por minuto en un cerebro completo.

teniéndose dentro de unos márgenes limitados.

Por idénticas consideraciones a las indicadas en el apartado 4. C. 2. 1. la actividad reductasa se ha expresado también como pmoles de MVA formado por min en el cerebro completo. En este caso (tabla XXVII, fig. 32) se observa un aumento muy patente en la actividad reductasa entre el día 8 y 19 de desarrollo embrionario para disminuir a partir de este momento.

4. D. 2. - VARIACIONES EN HIGADO

Como en el caso anterior, estudiamos las variaciones en este órgano de la HMG-CoA reductasa desde el día 10 de desarrollo embrionario hasta el día 5 posterior a la eclosión.

Según se muestra en la tabla XXVIII (fig. 33) la actividad reductasa se mantiene en niveles muy inferiores a los observados en cerebro y no presenta variaciones muy acusadas aunque parece disminuir un tanto entre el día 10 y el 16 manteniéndose en estos niveles hasta la eclosión. Tal como se indicaba en trabajos anteriores realizados en nuestro Departamento, tras la eclosión comienza a aumentar la actividad reductasa hepática.

4. D. 3. - VARIACIONES EN INTESTINO

La actividad reductasa determinada en intestino es, como en el caso del hígado, muy inferior a la observada en cerebro (tabla XXVIII) y también como en hígado se ha observado un marcado aumento en la actividad de esta enzima tras la eclosión (fig. 34), alcanzándose el día 5 niveles superiores a los del hígado.

TABLA XXVIII

Variación en la actividad específica HMG-CoA reductasa en hígado, intestino y riñón durante el desarrollo embrionario e inmediato a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Actividad reductasa (pmoles/mg prot/min)		
	Hígado	Intestino	Riñón
10	31.9 ± 3.21	----	----
12	42.0 ± 0.52	30.05 ± 1.22	27.20 ± 0.80
14	18.8 ± 0.79	35.24 ± 0.83	29.10 ± 1.50
16	11.8 ± 0.60	25.10 ± 1.98	30.05 ± 0.94
19	14.3 ± 1.43	23.62 ± 1.50	25.12 ± 2.02
21	20.1 ± 1.50	29.33 ± 1.99	19.42 ± 0.73
+2	18.8 ± 0.50	24.80 ± 1.30	20.07 ± 2.21
+5	71.1 ± 3.80	150.80 ± 12.62	16.54 ± 0.81

En el caso del hígado, muy inferior a la del cerebro (tabla XXVIII) y también como en hígado se ve un marcado aumento en la actividad de esta enzima a los 2 días de eclosión (fig. 24), alcanzándose el día 5 niveles

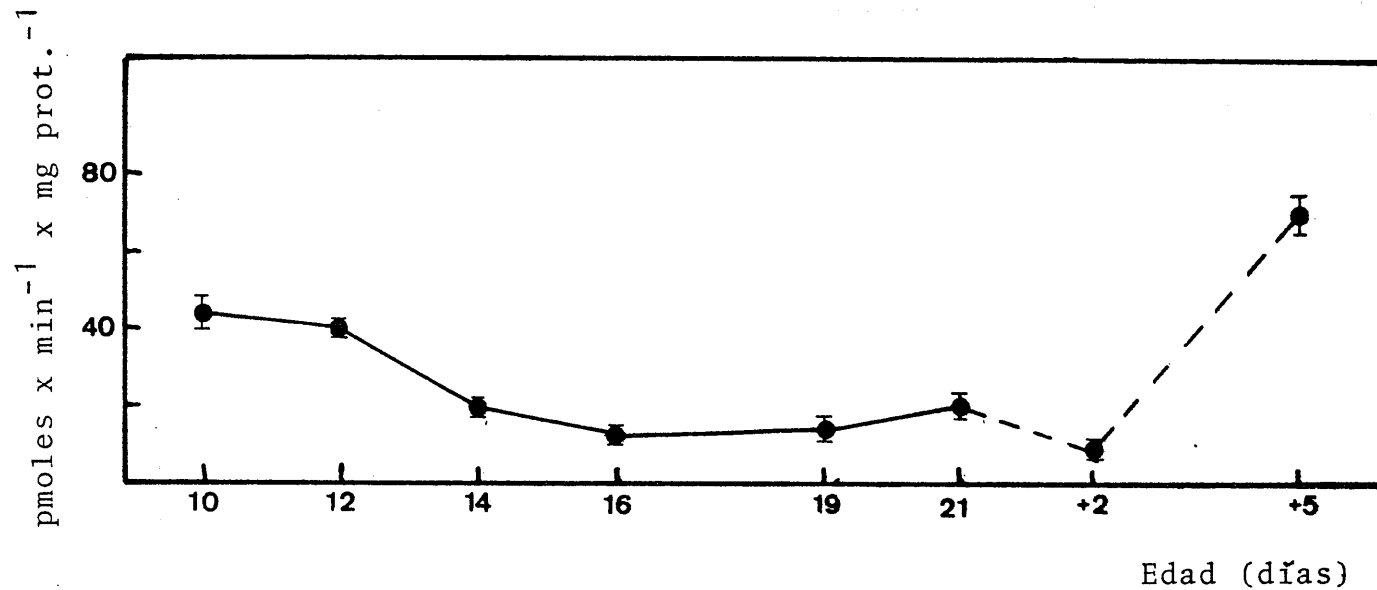


Fig. 33.- Variaciones de la actividad específica HMG-CoA reductasa de hígado de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del S.E.M.

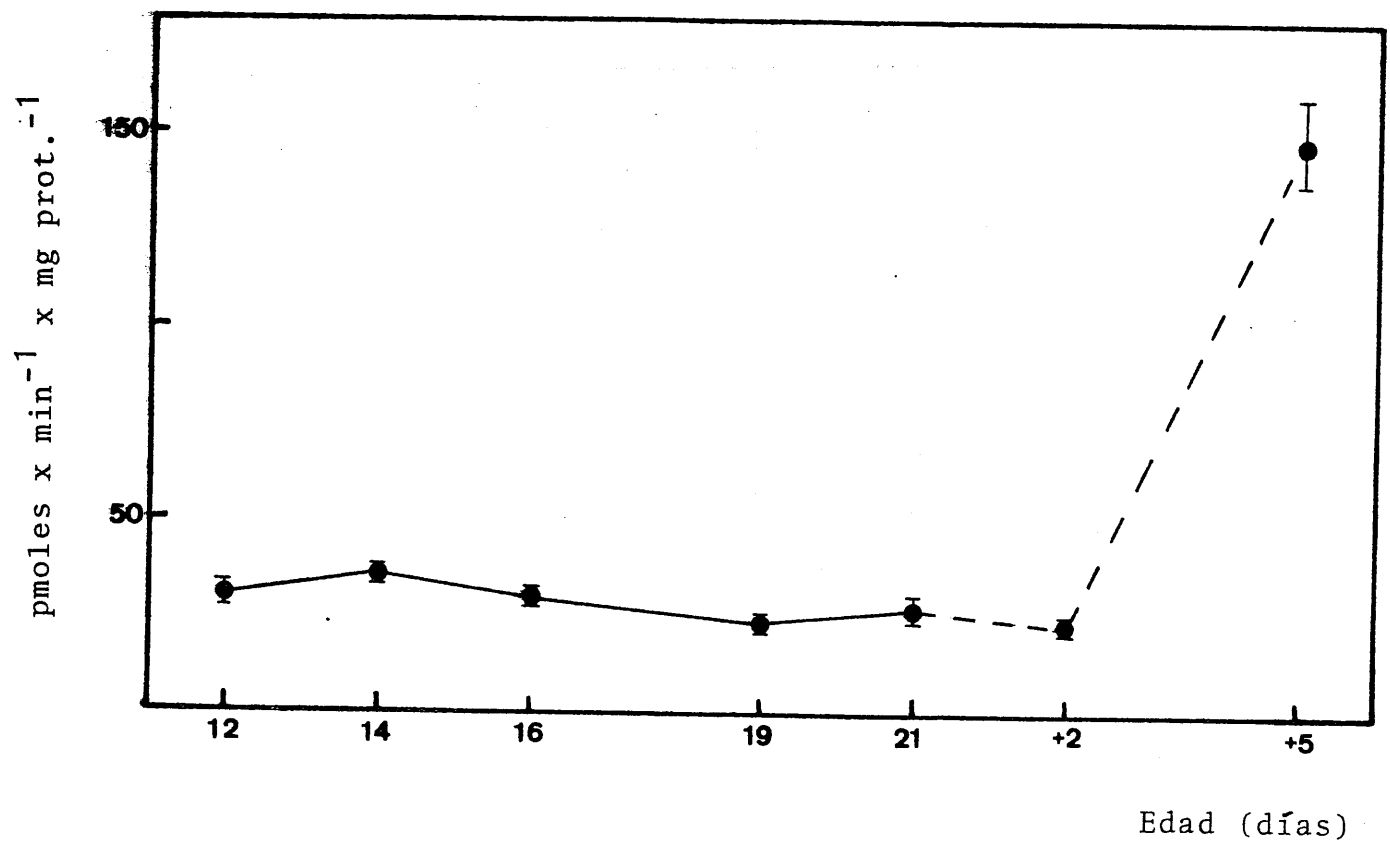


Fig. 34.- Variaciones de la actividad específica HMG-CoA reductasa de intestino de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del S.E.M.

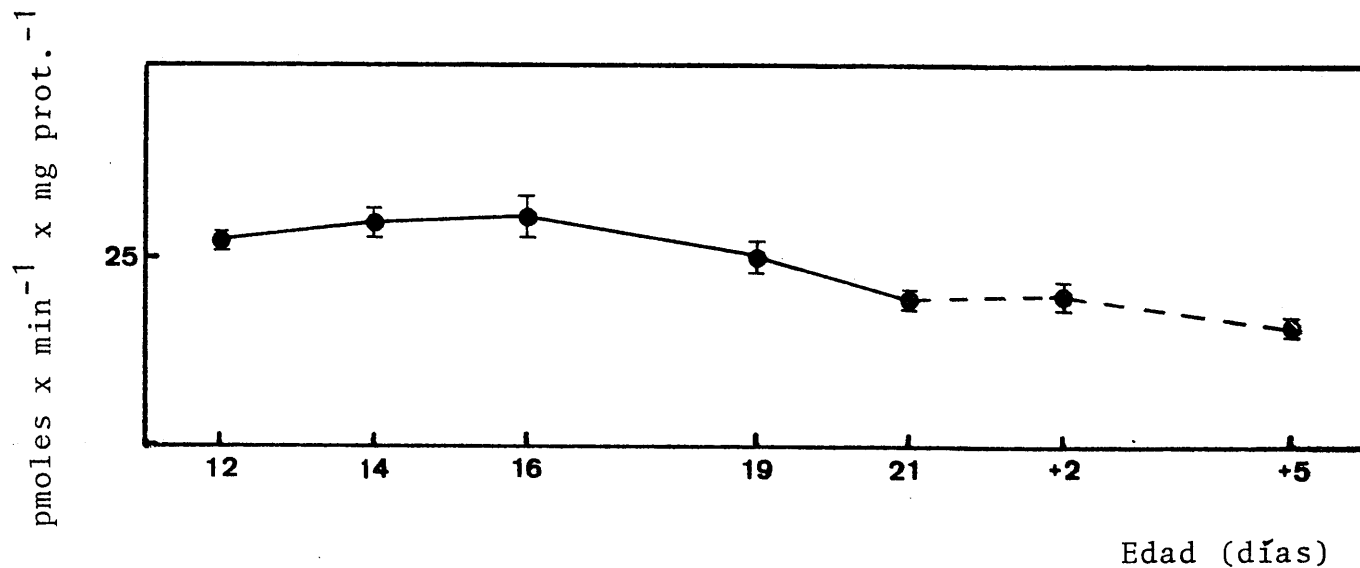
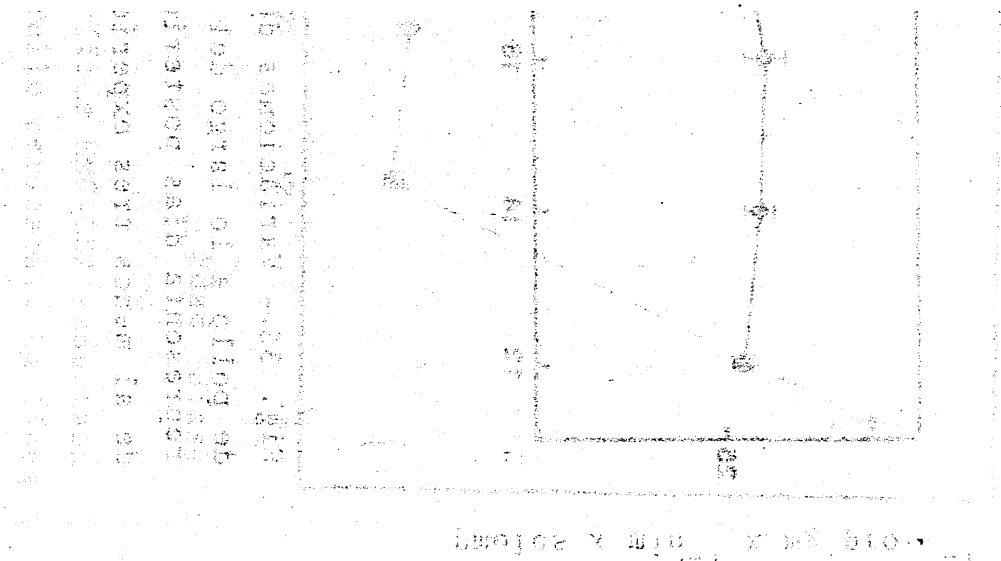


Fig. 35.- Variaciones de la actividad MHG-CoA reductasa de riñón de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión. Los resultados son media de al menos tres experiencias y van acompañados del S.E.M.

4. D. 4. - VARIACIONES EN RIÑON

En riñón, como en hígado e intestino, la actividad reductasa es muy baja a lo largo del desarrollo embrionario y no presenta grandes variaciones (tabla XXVIII fig.35) pero a diferencia de estos dos órganos no se ha observado un aumento similar en la actividad de la enzima tras la eclosión manteniéndose dentro de márgenes limitados a lo largo de todo el período estudiado.

Las determinaciones tanto en riñón como en intestino se han realizado a partir del día 12 de desarrollo embrionario, debido a que el pequeño peso que presentan ambos órganos no permitía tomar una cantidad de tejido suficiente para la determinación de la actividad reductasa.



4. E. - VARIACIONES EN LA CANTIDAD DE COLESTEROL Y FOSFOLÍPIDOS DE MICROSOMAS A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION

Puesto que la HMG-CoA reductasa es una enzima ligada a membranas microsomales y dado que se ha postulado un mecanismo de regulación de su actividad por cambios en la composición de estas membranas, hemos realizado el estudio de los componentes lipídicos de los microsomas en cerebro -en donde la actividad reductasa es muy elevada- y en hígado, con objeto de establecer las posibles variaciones en los componentes de la membrana microsomal de ambos órganos durante el desarrollo embrionario y postnatal. No nos ha parecido de interés ampliar el estudio al riñón e intestino puesto que no se han observado variaciones considerables en los parámetros estudiados en hígado o cerebro. Además en estos órganos, la actividad reductasa es mínima y no se han apreciado cambios en la actividad de la enzima durante el período embrionario.

4. E. 1.- MICROSOMAS DE CEREBRO

Se ha efectuado el estudio de las variaciones en los niveles de colesterol y fósforo lipídico en membranas microsomales entre el día 8 de desarrollo embrionario y 5 días tras la eclosión, así como de los porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado en microsomas durante el mismo período.

4. E. 1. 1. - Colesterol y fosfolípidos totales

En la tabla XXIX (fig. 36) se han representado las variaciones en el contenido en colesterol y fósforo lipídico totales en microsomas de cerebro. Según se puede apreciar la cantidad de colesterol total aumenta de forma patente entre

TABLA XXIX

Variaciones en el contenido en colesterol total, libre y esterificado, así como en el contenido en fósforo lipídico y en la relación molar C/P en microsomos de cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los días precedidos del signo + se refieren a días tras la eclosión.

Edad del embrión (días)	Colesterol (µg/mg prot)			Colesterol (%)		Fósforo µg/mg	Relación C/P
	Total	Libre	Esterif.	Libre	Esterif.		
8	51.95	45.61	6.34	87.80	12.20	13.36	0.310
10	53.45	45.85	7.63	85.71	14.28	14.96	0.285
12	75.86	68.54	7.31	90.36	9.64	16.83	0.359
14	92.90	86.44	6.46	93.05	6.95	19.31	0.384
16	72.44	66.51	5.93	91.81	8.19	20.50	0.281
19	56.67	51.65	5.01	91.15	8.84	16.25	0.278
21	53.77	51.53	2.24	95.83	4.17	16.15	0.265
+2	52.04	47.71	4.33	91.67	8.33	14.58	0.285
+5	47.26	43.94	3.31	92.98	7.01	14.58	0.258

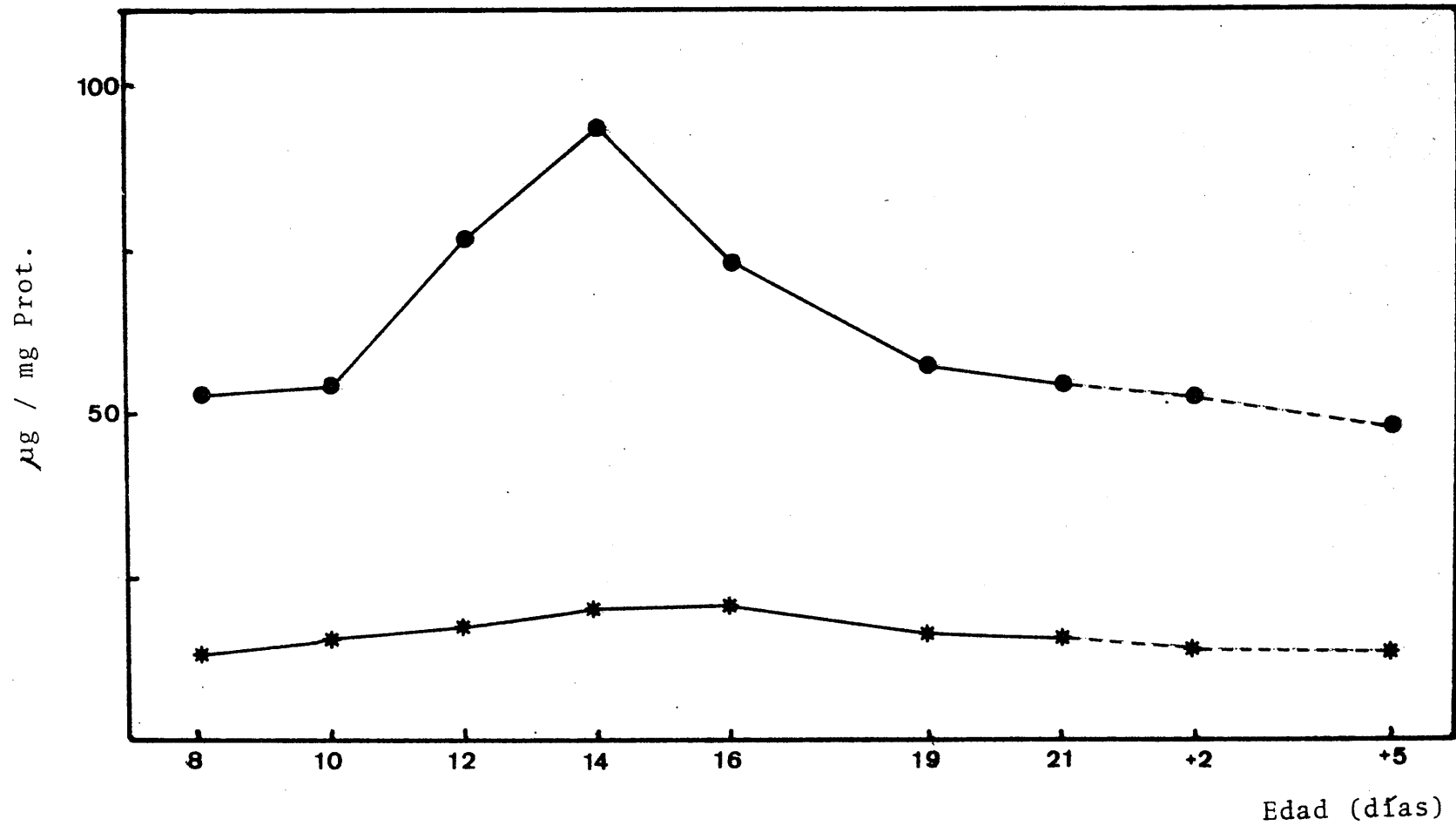


Fig. 36.- Variación en los niveles de colesterol (●) y fósforo lipídico (*) de membranas microsomales de cerebro de pollo durante el período embrionario e inmediato a la eclosión. Las líneas discontinuas representan los días posteriores a la eclosión.

el día 10 y 14 de desarrollo embrionario para descender posteriormente hasta los valores iniciales el día 19 de incubación. Asimismo se observa un ligero aumento en el nivel de fosfolípidos entre el día 8 y el 16 descendiendo a partir de este momento a los valores iniciales.

4. E. 1. 2. - Porcentaje de colesterol libre y esterificado

En la tabla XXIX aparecen indicados los porcentajes relativos de colesterol libre y esterificado respecto al total en microsomas de cerebro. Como podemos apreciar (fig. 37) el colesterol libre se halla siempre en niveles muy superiores a los del esterificado, tal como ocurría en el caso del cerebro completo.

4. E. 1. 3. - Relación molar colesterol / fósforo lipídico

Puesto que la relación molar C/P es un índice del grado de fluidez que presenta una membrana, se ha realizado el cálculo de esta relación con objeto de determinar si ésta varía a lo largo del período estudiado. En la tabla XXIX (fig. 38) se han representado los resultados obtenidos y, según se observa, no parecen existir variaciones apreciables en este parámetro a lo largo del período estudiado manteniéndose los niveles en valores que oscilan entre aproximadamente 0.3 y 0.4.

4. E. 2. - MICROSOMAS DE HIGADO

Al igual que en cerebro, se han estudiado los componentes lipídicos de la membrana microsomal en hígado, entre el día 10 de incubación y el día 5 tras la eclosión.

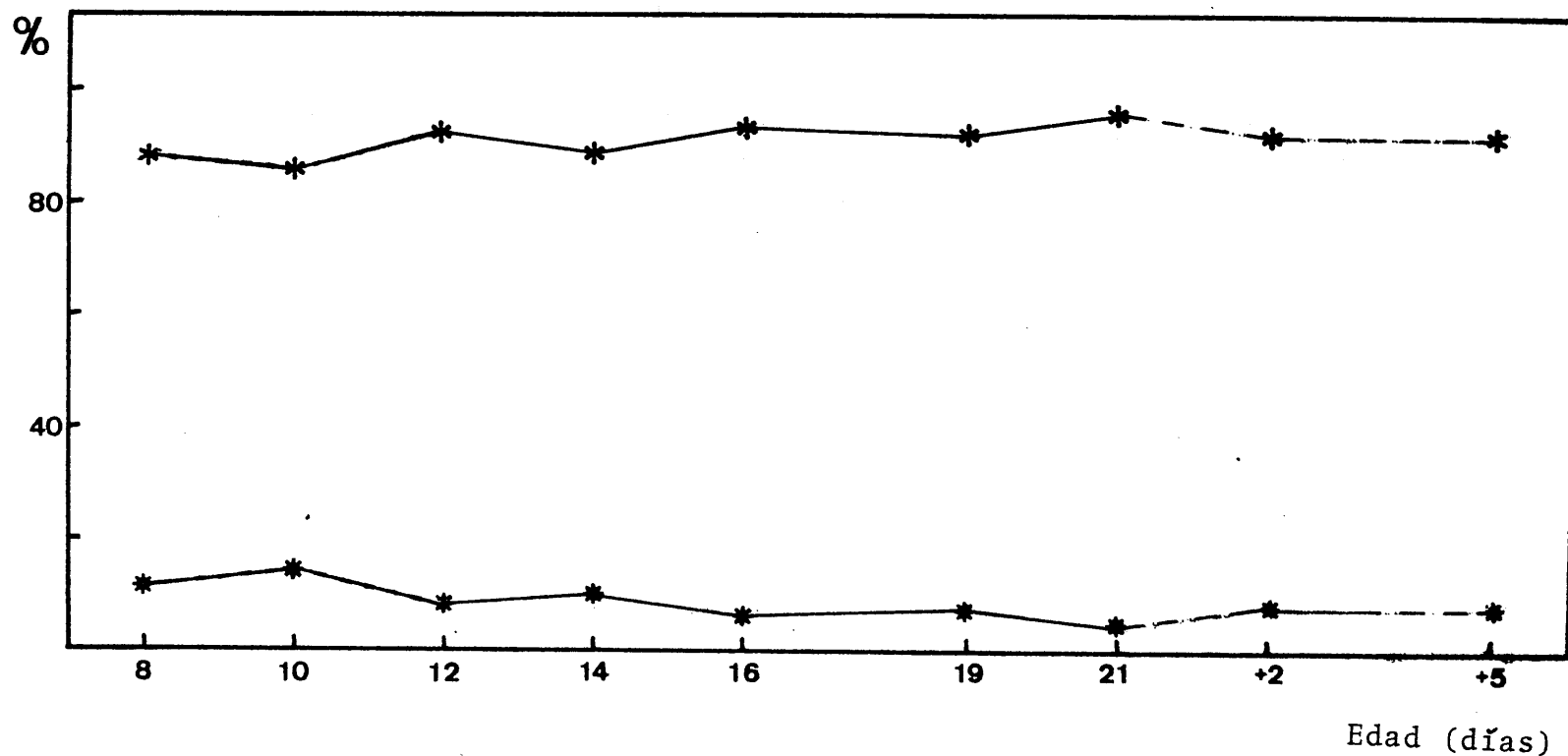


Fig. 37.- Variación en los porcentajes de colesterol libre (*) y esterificado (*) respecto al total en membranas microsomales de cerebro de pollo durante el período perinatal. Las líneas discontinuas representan los días posteriores a la eclosión.

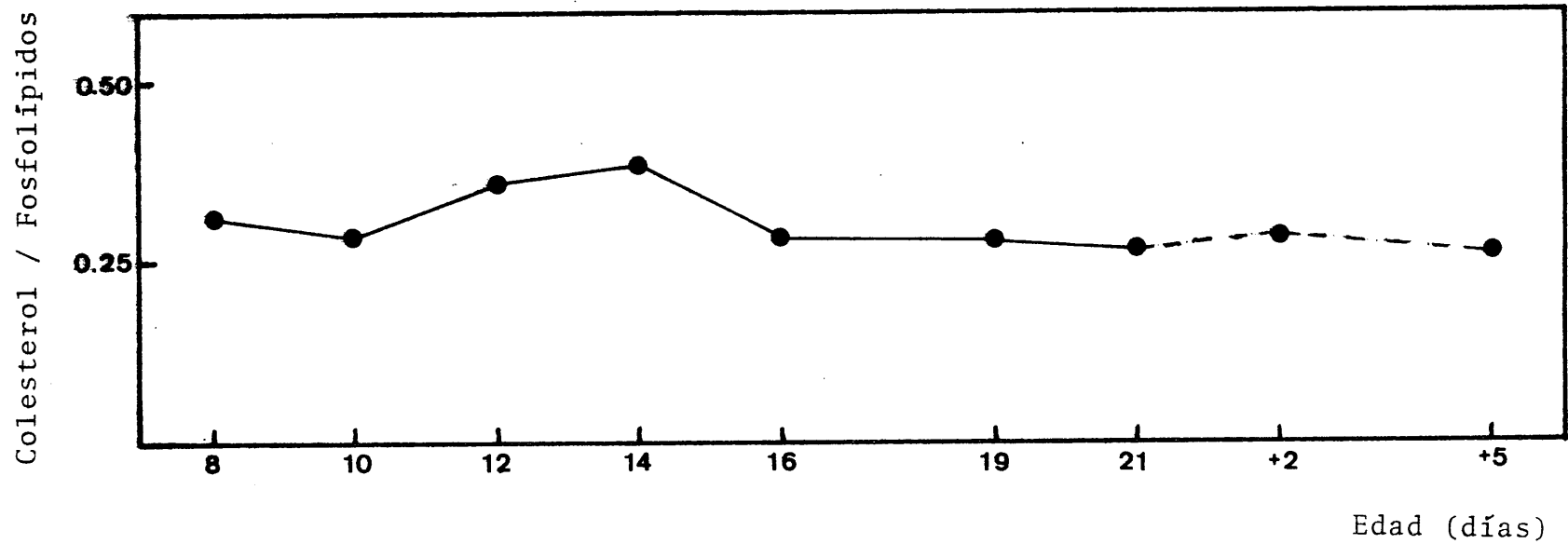


Fig. 38.- Variación en la relación molar colesterol / fósforo lipídico de los microsomas de cerebro a lo largo del período perinatal. La línea discontinua representa los días posteriores a la eclosión.

4. E. 2. 1. - Colesterol y fosfolípidos totales

Los resultados de la tabla XXX ponen de manifiesto que no se han observado variaciones muy acusadas en la cantidad de colesterol microsomal ni en la de fosfolípidos totales (fig. 39). El nivel de fósforo total microsomal parece aumentar un tanto entre el día 10 y el 14 de incubación para descender a partir de este momento hasta el día 2 tras la eclosión.

4. E. 2. 2. - Porcentaje de colesterol libre y esterificado

A diferencia de lo que ocurría en hígado durante la última semana de incubación en donde el colesterol esterificado suponía un porcentaje mayoritario del colesterol total, en microsomas de hígado es el colesterol libre el que se halla en un porcentaje mayoritario ya que durante todo el período estudiado supone alrededor del 60% del colesterol total microsomal (tabla XXX, fig. 40).

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

También en hígado se ha realizado el cálculo de la relación molar colesterol / fosfolípidos. Los resultados obtenidos se han representado en la tabla XXX. Al igual que en cerebro, tampoco en hígado se observa un cambio considerable en la relación C/P durante el período embrionario y postnatal (fig. 41).

TABLA XXX

Variación en el contenido en colesterol total, libre y esterificado, así como en el contenido en fósforo lipídico y en la relación molar C/P en microsomas de hígado de pollo durante el desarrollo perinatal.

Edad del embrión (días)	Colesterol (µg/mg prot)			Colesterol (%)		Fósforo	Relación C/P
	Total	Libre	Esterif.	Libre	Esterif.	µg/mg	
10	41.13	24.65	16.48	60.00	40.00	7.54	0.435
12	46.43	25.80	20.63	55.56	44.44	10.01	0.369
14	43.38	28.20	15.18	65.00	35.00	11.07	0.312
16	49.00	29.88	19.12	60.98	39.02	10.09	0.387
19	43.90	27.73	16.17	63.16	36.84	10.39	0.336
21	45.58	33.33	12.25	73.13	26.87	9.79	0.371
+2	33.71	19.92	13.79	59.09	40.91	7.92	0.339
+5	37.76	26.90	10.86	71.25	28.75	9.35	0.322

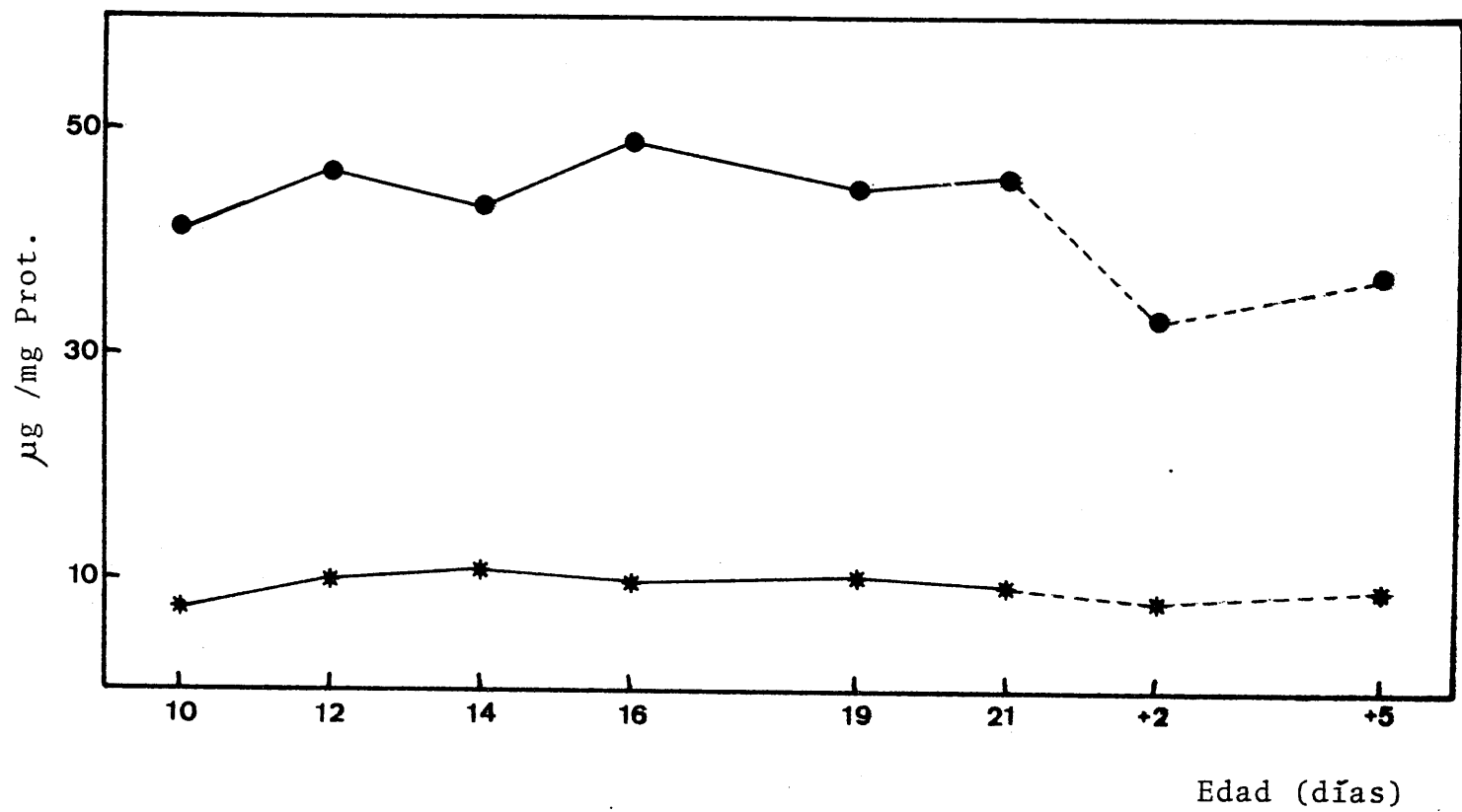


Fig. 39.- Variación en los niveles de colesterol (●) y fósforo lipídico (*) de membranas microsomales de hígado de pollo durante el período embrionario e inmediato a la eclosión. Las líneas discontinuas representan los días posteriores a la eclosión.

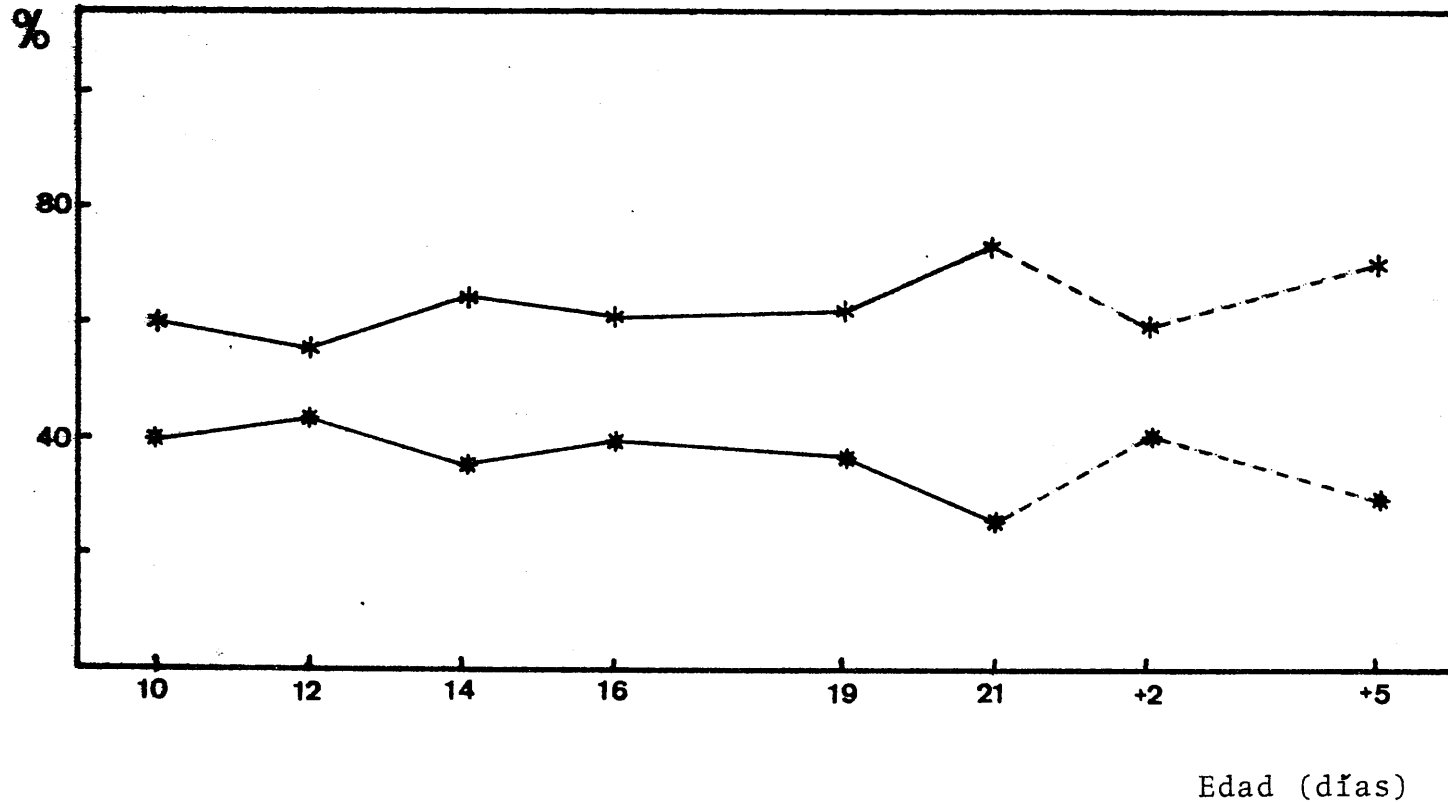


Fig. 40.- Variación en los porcentajes de colesterol libre (*) y esterificado (*) respecto al total en membranas microsomales de hígado de pollo durante el período perinatal. Las líneas discontinuas representan los días posteriores a la eclosión.

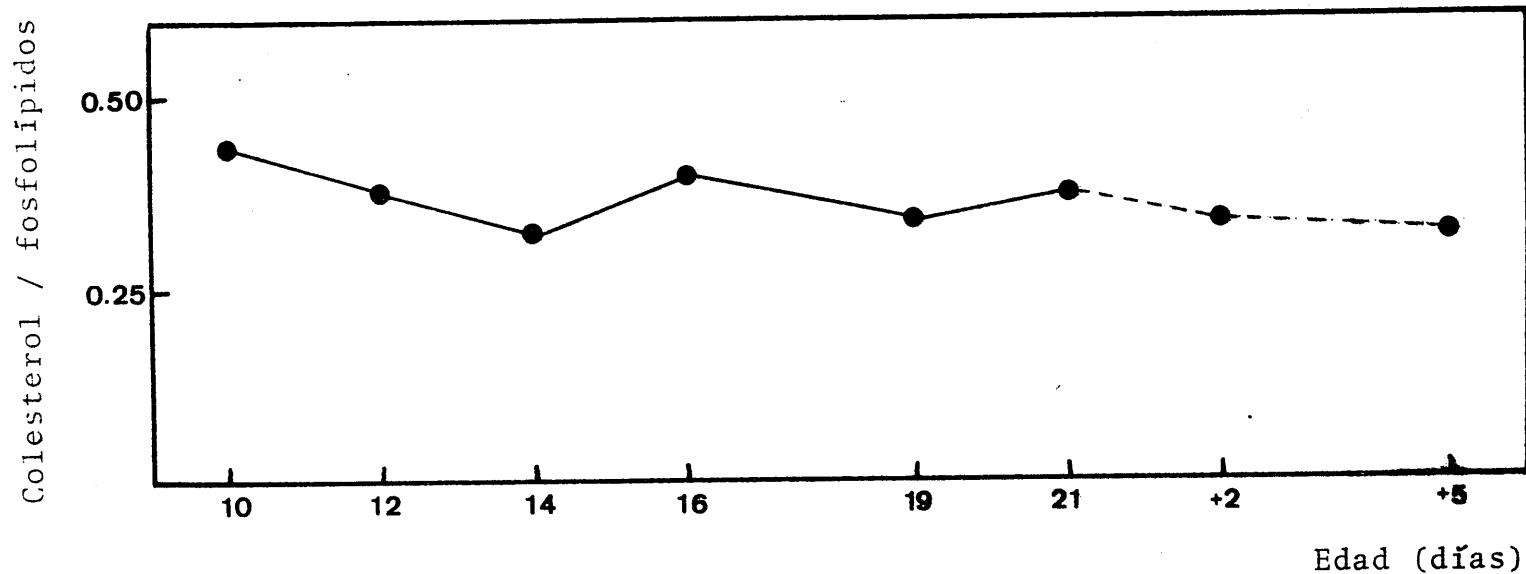


Fig. 41.- Variación en la relación molar colesterol / fósforo lipídico de los microsomas de hígado de pollo a lo largo del período perinatal. La línea discontinua representa los días posteriores a la eclosión.

4. F. INCORPORACION DE 1-¹⁴C- ACETATO A LIPIDOS INSAPONIFICABLES A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E INMEDIATO A LA ECLOSION

Puesto que la HMG-CoA reductasa es la enzima reguladora más importante de todo el proceso de colesterogénesis a partir de acetato, se han comparado las variaciones en la actividad reductasa a lo largo del desarrollo perinatal con la capacidad de utilización de acetato, por el cerebro e hígado de embrión de pollo. No se ha ampliado este estudio al riñón e intestino puesto que su actividad reductasa era ínfima y tras comprobar los niveles bajísimos de incorporación existentes en el hígado embrionario, niveles que están de acuerdo con la escasa actividad enzimática observada en el mismo órgano.

4. F. 1. - INCORPORACION EN CEREBRO

La incorporación de acetato a insaponificables totales por el cerebro, expresada en nmoles / h / g de tejido, disminuye marcadamente a lo largo del desarrollo embrionario (tabla XXXI), de tal forma que en el momento de la eclosión la velocidad de incorporación es unas 16 veces menor que la observada en el embrión de 10 días (fig. 42).

Sin embargo, la capacidad de incorporación de acetato por el cerebro completo, expresada en nmoles / h / cerebro (tabla XXXI) no presenta variaciones tan acusadas, observándose incluso un ligero aumento hacia el día 16 para disminuir después hasta la eclosión (fig. 43).

TABLA XXXI

Variación en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables totales	
	nmoles / h / g incorporados	nmoles / h / cerebro incorporados
10	16.890 ± 0.674	2.325 ± 0.024
12	9.120 ± 0.962	2.297 ± 0.243
14	6.710 ± 0.419	2.434 ± 0.152
16	5.346 ± 0.473	3.018 ± 0.267
19	1.536 ± 0.112	1.229 ± 0.098
21	0.767 ± 0.085	0.557 ± 0.062
+2	0.436 ± 0.043	0.371 ± 0.037

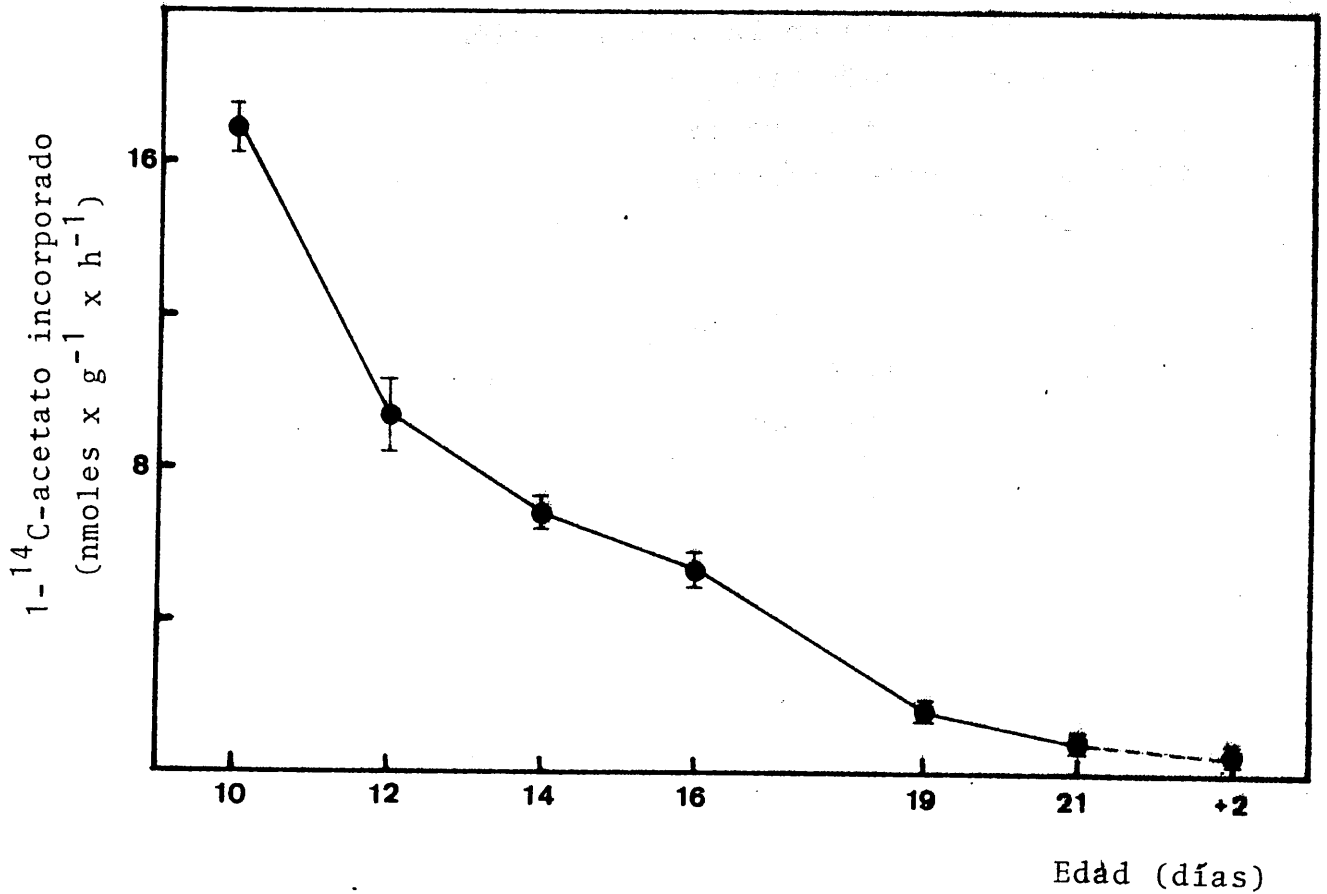


Fig. 42.- Cambios en la incorporación de 1-¹⁴C acetato a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo a lo largo del período perinatal. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por gramo y por hora. Los valores son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión.

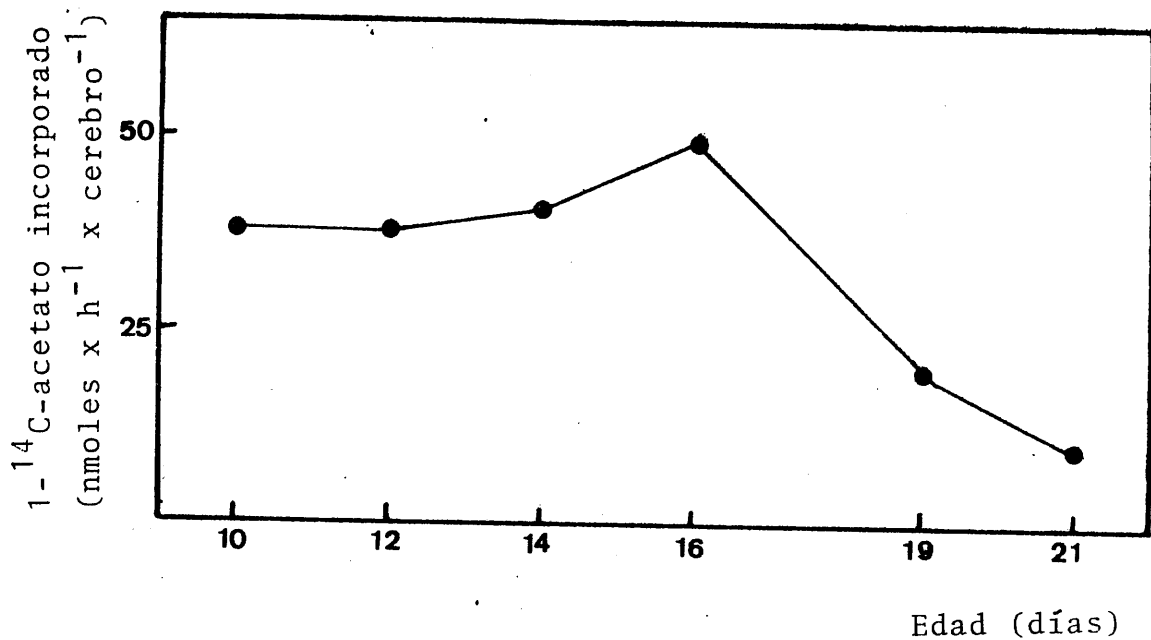


Fig. 43.-Cambios en la incorporación de 1-¹⁴C-acetato a lípidos insaponificables totales en cerebro de pollo a lo largo del desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por hora por el cerebro completo.

TABLA XXXII

Variación en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (nmoles/g/h)				
	Escualeno	Lanosterol	Colesterol	Desmosterol	Desconocido
10	0.562 ± 0.070	1.877 ± 0.130	5.988 ± 0.24	5.198 ± 0.22	3.183 ± 0.17
12	0.188 ± 0.050	0.192 ± 0.160	3.902 ± 0.42	2.345 ± 0.26	1.770 ± 0.22
14	0.176 ± 0.020	0.956 ± 0.060	3.177 ± 0.21	1.733 ± 0.17	0.728 ± 0.07
16	0.101 ± 0.030	0.535 ± 0.090	2.287 ± 0.21	1.375 ± 0.13	1.038 ± 0.12
19	0.066 ± 0.020	0.182 ± 0.020	0.788 ± 0.07	0.275 ± 0.03	0.225 ± 0.03
21	0.033 ± 0.017	0.061 ± 0.008	0.396 ± 0.05	0.097 ± 0.01	0.290 ± 0.02
+2	0.013 ± 0.001	0.034 ± 0.001	0.230 ± 0.01	0.047 ± 0.01	0.110 ± 0.01

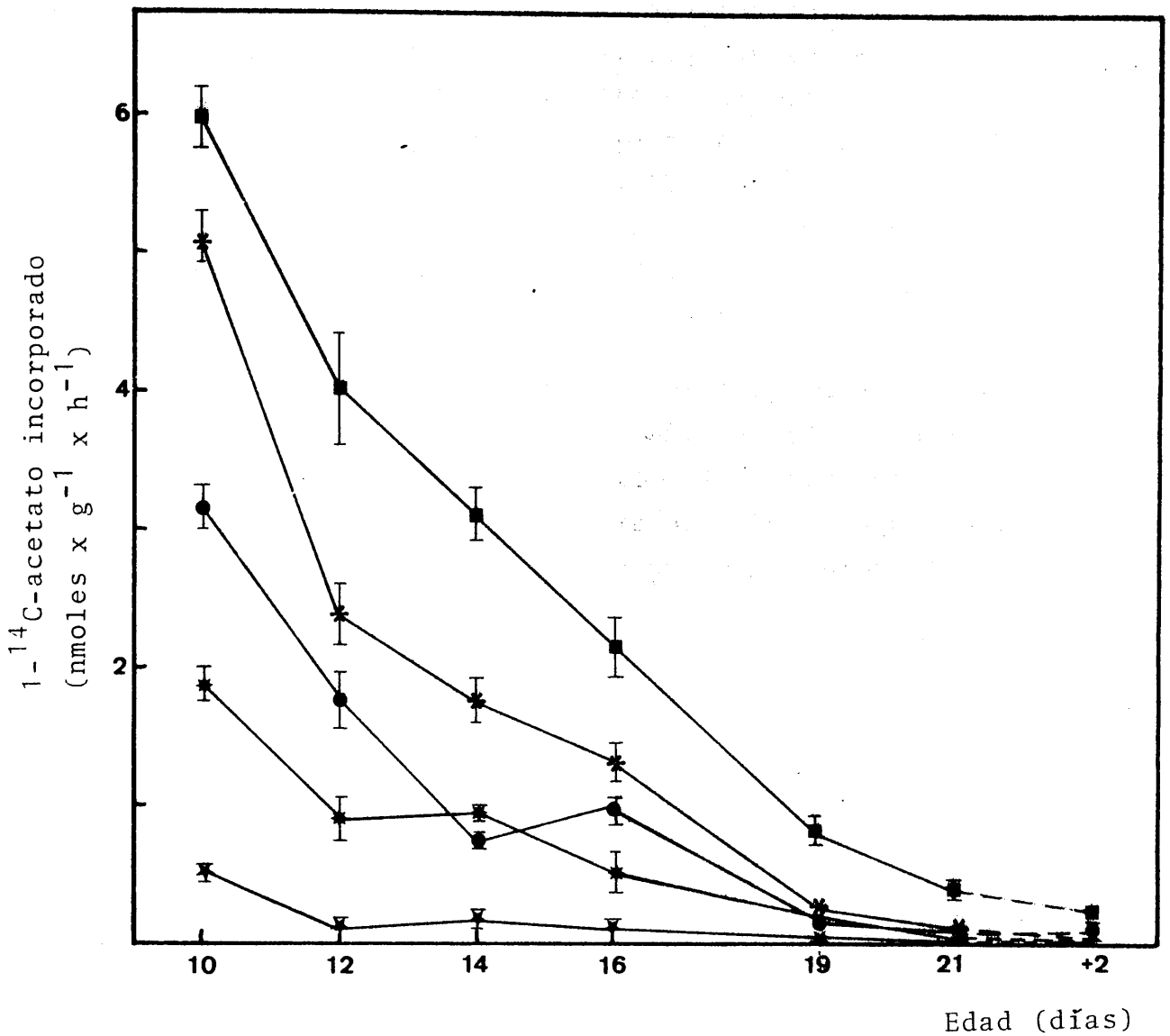


Fig. 44.-Variación en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el período perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (x) escualeno; (*) lanosterol; (■) colesterol; (x) desmosterol; (●) no identificado.

La incorporación a cada uno de los distintos insaponificables estudiados presenta en general el mismo perfil que en los totales, (tabla XXXII), siendo especialmente patente la disminución de la incorporación a colesterol, desmosterol y compuesto no identificado semejante al descrito en la incorporación de MVA (fig. 44). Los cambios en la incorporación de acetato a lanosterol y escualeno a lo largo de la misma etapa del desarrollo son muchos menos acusados.

Los porcentajes relativos de incorporación de acetato a los distintos lípidos insaponificables (tabla XXXIII) se han representado en la fig. 45. Mientras que el porcentaje de incorporación de acetato a escualeno, lanosterol y compuesto desconocido no sufre grandes variaciones, el porcentaje de incorporación a colesterol aumenta desde el día 10 al 21 mientras que el % de incorporación a desmosterol disminuye de forma similar durante el mismo período.

4. F. 2. - INCORPORACION EN HIGADO

En la tabla XXXIV se ha representado la incorporación de acetato a lípidos insaponificables totales en hígado de embrión de pollo. Como podemos apreciar, la incorporación de acetato por el hígado se realiza en una tasa mínima. Cuando los resultados se expresan por gramo de tejido (fig. 46) incluso se observa una disminución a lo largo del desarrollo embrionario, mientras que la incorporación por el hígado completo, a pesar de ser muy inferior a la del cerebro, presenta un perfil más o menos semejante al obtenido en este órgano, sin variaciones muy acusadas durante la misma etapa de desarrollo (fig. 47).

TABLA XXXIII

Variación en el porcentaje de incorporación de 1-¹⁴C-acetato a distintos lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Lanosterol	Colesterol	Desmosterol	Desconocido
10	3.33 ± 0.41	11.12 ± 0.63	35.46 ± 0.12	30.78 ± 0.41	18.85 ± 0.70
12	2.06 ± 0.45	10.01 ± 1.36	42.79 ± 0.82	25.72 ± 0.83	19.41 ± 1.37
14	2.62 ± 0.15	14.24 ± 1.05	46.45 ± 1.03	25.83 ± 0.64	10.85 ± 0.75
16	2.53 ± 0.42	10.69 ± 0.75	46.31 ± 0.72	26.47 ± 0.69	14.01 ± 1.11
19	4.28 ± 1.00	11.88 ± 0.50	51.28 ± 2.08	17.93 ± 1.04	14.62 ± 1.62
21	4.27 ± 0.73	8.02 ± 0.48	51.64 ± 1.77	12.70 ± 0.27	23.37 ± 1.76
+2	2.95 ± 0.25	7.87 ± 0.16	53.04 ± 1.78	10.79 ± 1.31	25.35 ± 0.56

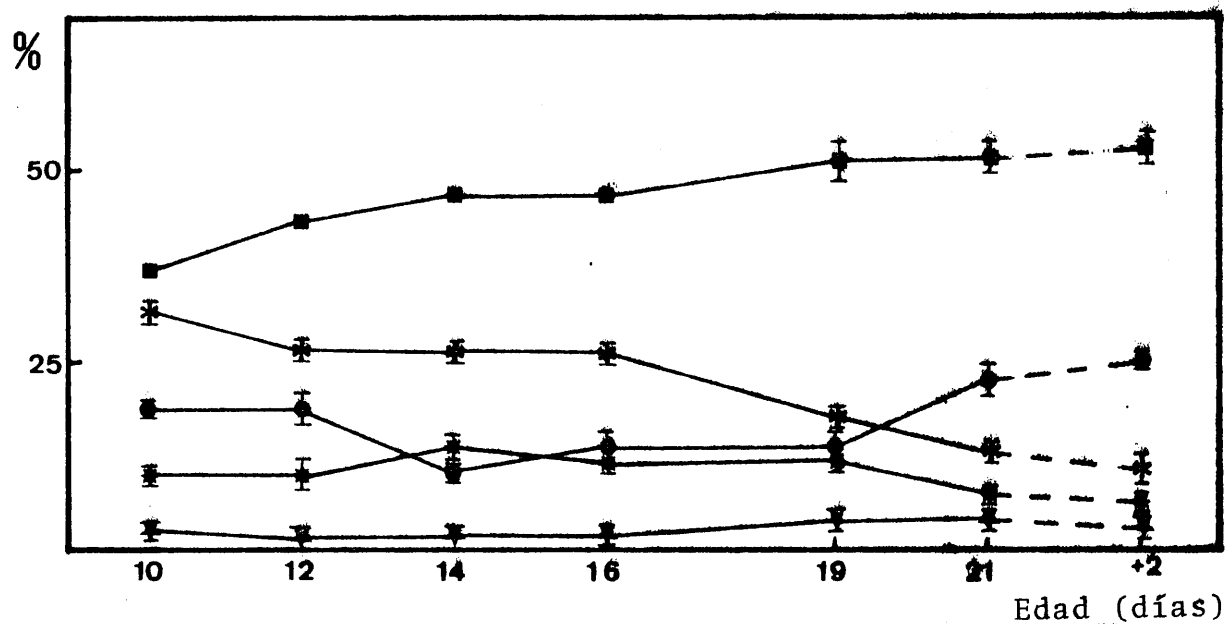


Fig. 45.- Variación en el porcentaje de incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables en cerebro de pollo durante el período perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (■) lanosterol; (▲) colesterol; (●) desmosterol; (●) no identificado.

TABLA XXXIV

Variación en la incorporación de 1-¹⁴C-acetato a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañadas del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables totales	
	pmoles/g /h	pmoles/h/hígado
10	746.64 ± 18.42	26.60 ± 0.64
12	506.95 ± 42.75	44.00 ± 3.72
14	443.87 ± 31.20	89.79 ± 6.40
16	194.31 ± 1.68	55.84 ± 0.47
19	115.23 ± 1.63	40.49 ± 0.82
21	68.23 ± 4.88	45.15 ± 3.15
+2	125.12 ± 1.18	----

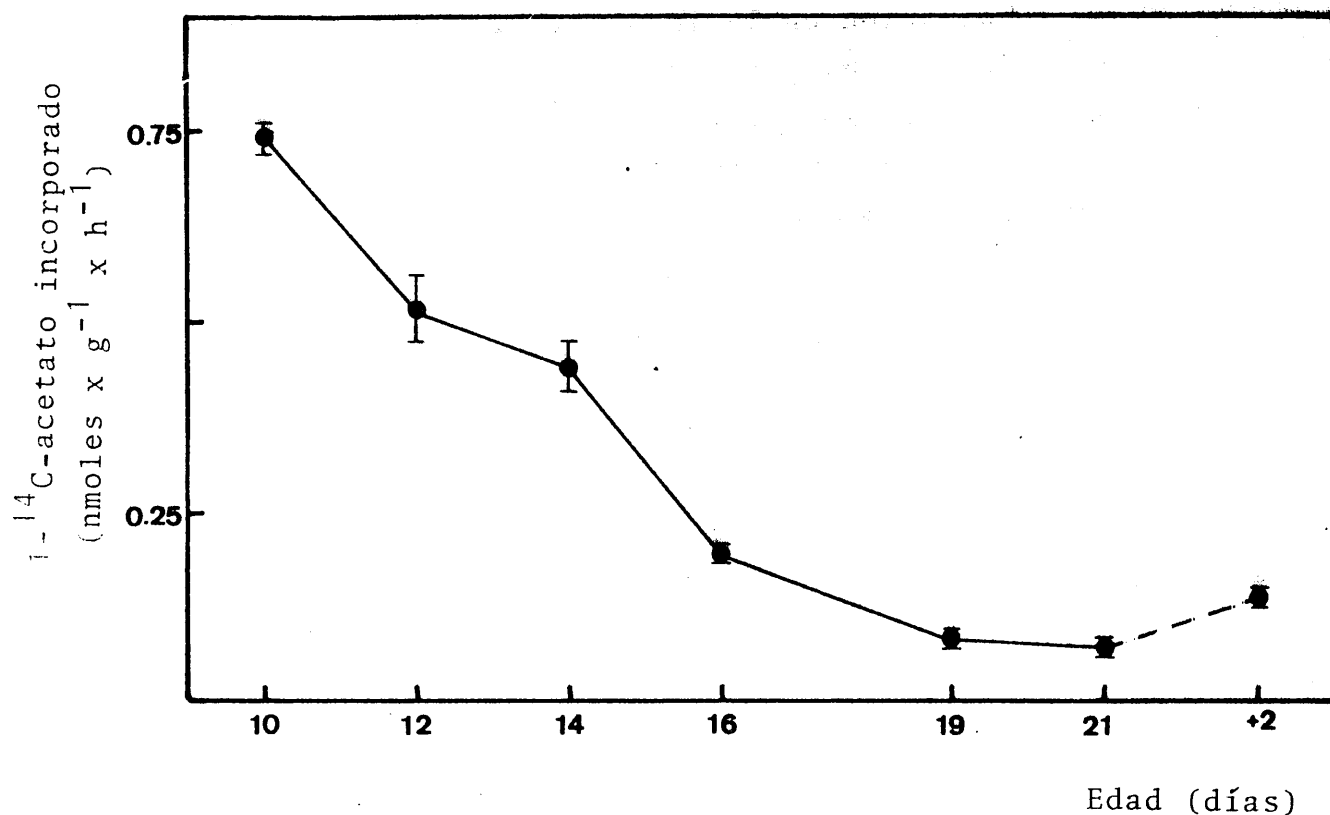


Fig. 46.- Cambios en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables totales durante el desarrollo embrionario, en hígado de pollo. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por gramo y por hora. Los valores son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. La línea discontinua representa días posteriores a la eclosión.

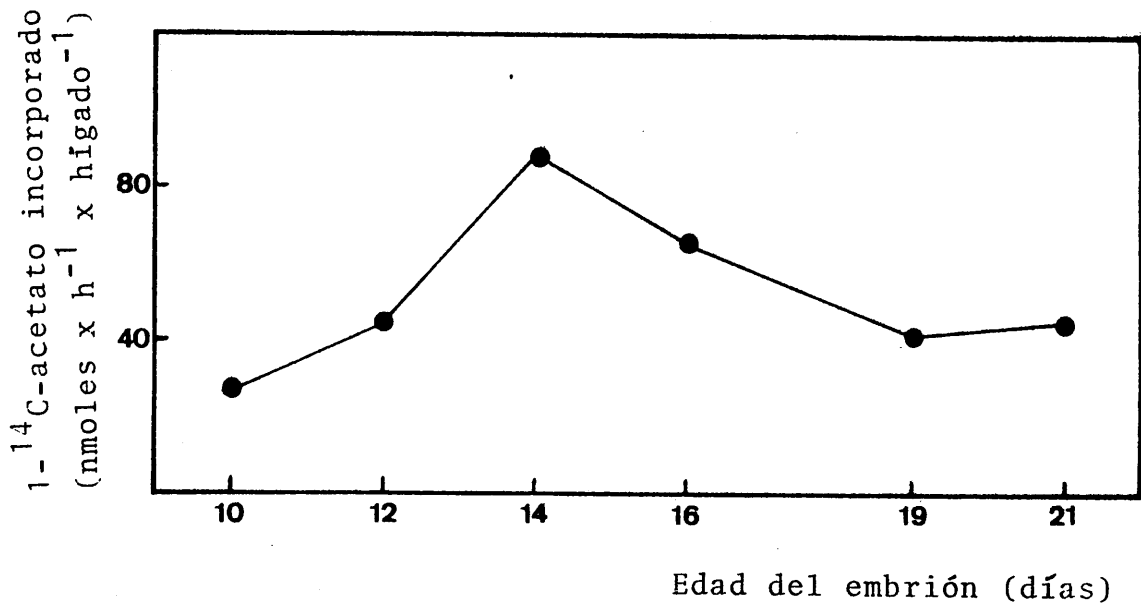


Fig. 47.- Cambios en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables totales en hígado de pollo durante el desarrollo embrionario. Los resultados se expresan como nmoles incorporados por hora por el hígado completo.

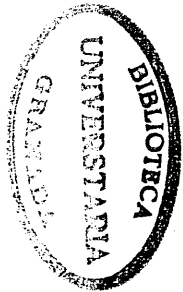
En cuanto a la incorporación de acetato a los distintos lípidos insaponificables, los resultados se indican en la tabla XXXV. El nivel de incorporación a colesterol es, en este caso, superior al observado para el resto de los insaponificables (fig. 48). Por otra parte, mientras que la incorporación a escualeno, lanosterol y ubiquinona no varía de forma apreciable, se ha observado una acusada disminución desde el día 10 al 21 de desarrollo embrionario en la incorporación a colesterol y al insaponificable no identificado.

En la tabla XXXVI se han representado los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje relativo de incorporación a los distintos lípidos insaponificables. Desde el día 10 al 19 la incorporación a lanosterol, escualeno y ubiquinona se halla en un porcentaje bastante bajo (inferior al 15%) mientras que el % de incorporación a colesterol es muy superior a la del resto de los lípidos insaponificables, disminuyendo marcadamente sólo hacia el final del período de incubación, en donde los porcentajes de todos los lípidos se aproximan (fig. 49).

TABLA XXXV

Variación en la incorporación de 1-¹⁴C-acetato a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo a lo largo del desarrollo perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (pmoles/g/h)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	96.99 ± 21.78	47.48 ± 15.27	67.27 ± 2.61	320.78 ± 8.64	199.50 ± 24.10
12	28.64 ± 6.26	21.69 ± 2.28	43.14 ± 6.19	268.83 ± 22.67	144.58 ± 14.36
14	33.39 ± 8.92	31.60 ± 9.10	48.82 ± 5.40	231.74 ± 29.75	98.45 ± 13.00
16	11.68 ± 2.79	9.89 ± 0.87	17.97 ± 1.48	122.67 ± 4.99	32.04 ± 1.14
19	8.72 ± 2.69	10.19 ± 0.14	12.28 ± 0.60	70.59 ± 2.18	16.04 ± 1.24
21	13.95 ± 2.55	10.38 ± 0.74	13.31 ± 1.40	19.56 ± 4.65	11.83 ± 1.12
+2	23.82 ± 5.12	31.49 ± 5.95	13.30 ± 0.49	24.74 ± 1.39	35.53 ± 7.50



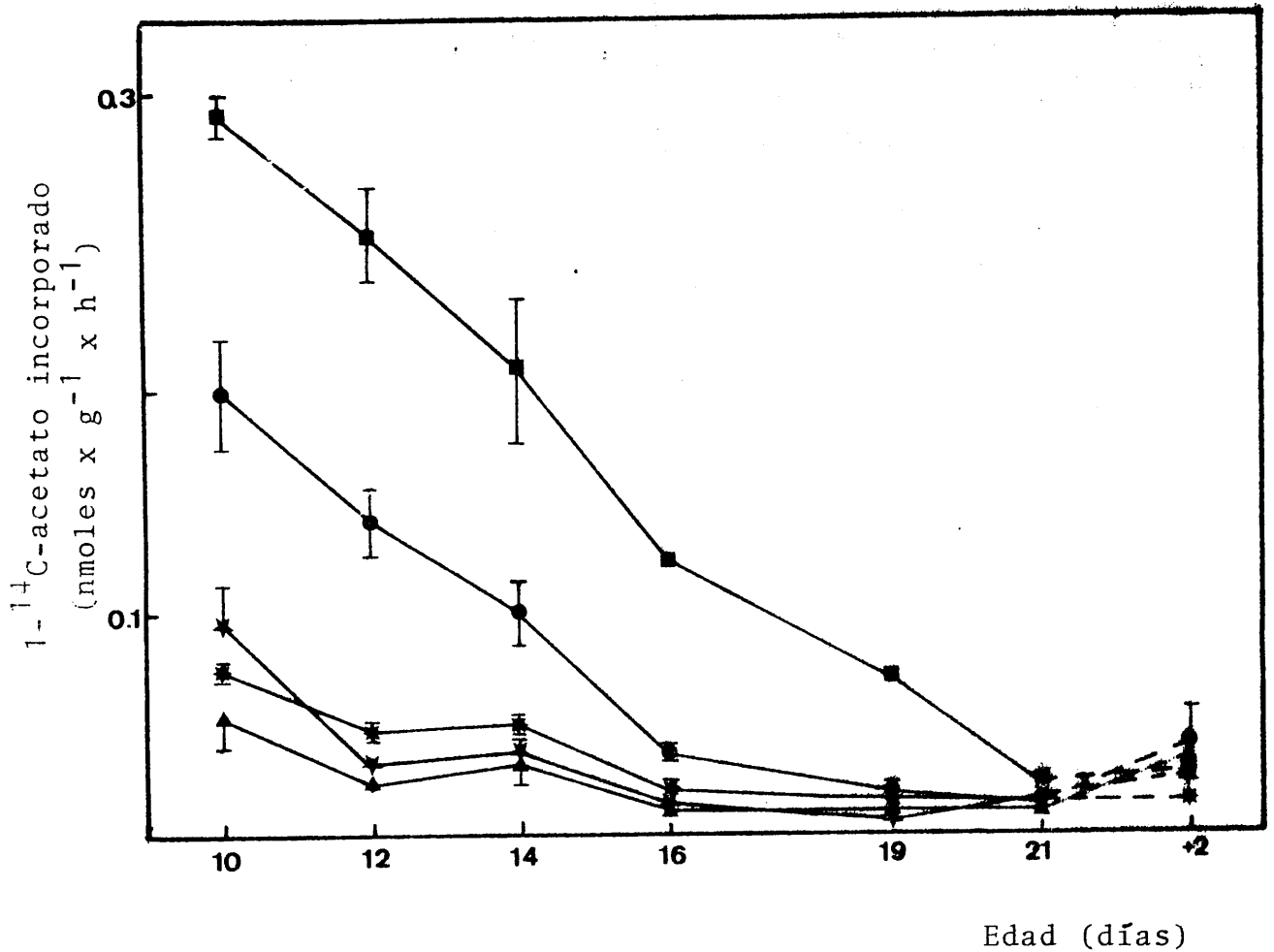


Fig. 48.- Variación en la incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el período perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★) escualeno; (*) lanosterol; (■) colesterol; (▲) ubiquinona; (●) no identificado.

TABLA XXXVI

Variación en el porcentaje de incorporación de 1-¹⁴C-acetato a distintos lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el desarrollo perinatal. Los resultados se expresan como media de al menos cuatro determinaciones y van acompañados del error estándar de la media.

Edad del embrión (días)	Lípidos insaponificables (%)				
	Escualeno	Ubiquinona	Lanosterol	Colesterol	Desconocido
10	12.99 ± 2.90	6.36 ± 2.04	9.01 ± 0.27	42.91 ± 0.47	26.72 ± 3.16
12	5.65 ± 1.14	4.28 ± 0.27	8.51 ± 0.99	53.03 ± 0.08	28.52 ± 1.50
14	7.50 ± 1.94	7.12 ± 1.99	11.00 ± 0.94	52.21 ± 5.60	22.18 ± 2.47
16	6.01 ± 1.44	5.09 ± 0.45	9.25 ± 0.76	63.13 ± 2.51	16.49 ± 0.57
19	7.57 ± 2.43	8.84 ± 0.03	10.66 ± 0.50	61.26 ± 1.69	13.91 ± 1.06
21	20.45 ± 3.44	15.22 ± 2.12	19.51 ± 1.52	28.67 ± 6.50	17.34 ± 1.09
+2	19.04 ± 4.41	25.17 ± 4.75	10.63 ± 0.38	19.77 ± 1.10	28.40 ± 6.24

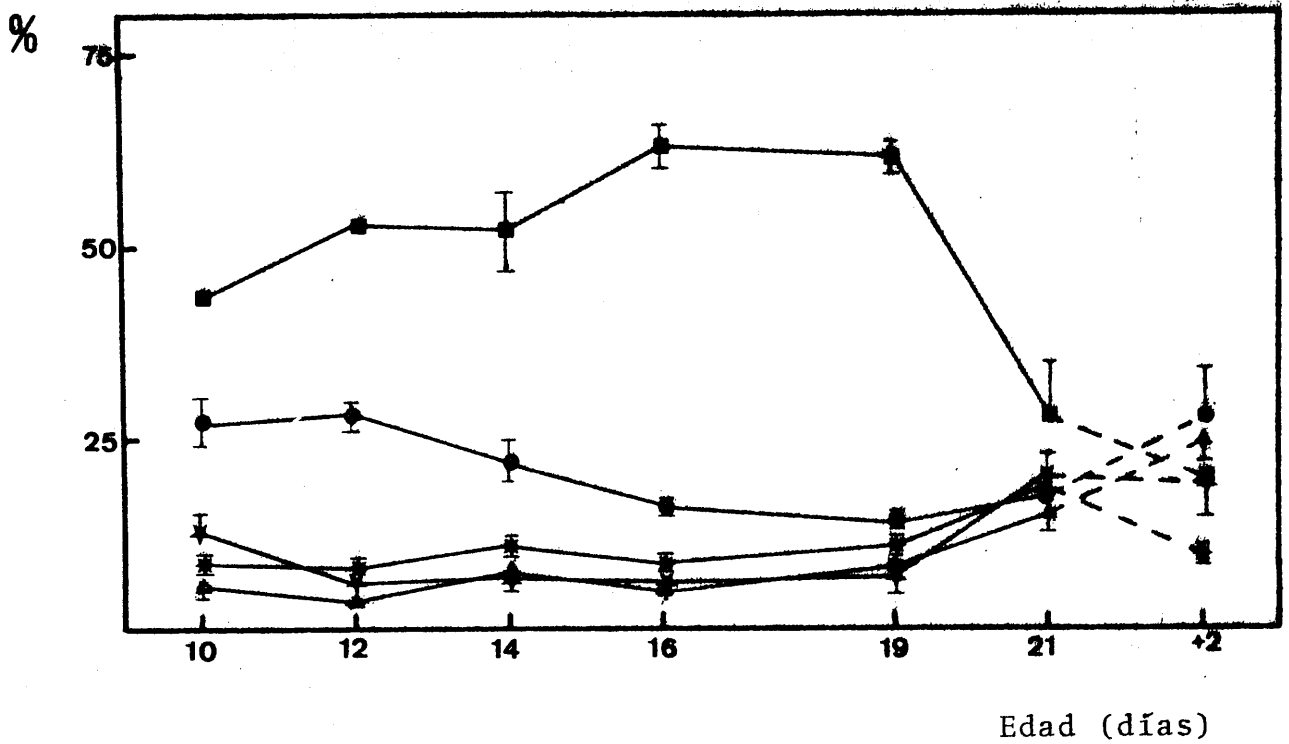


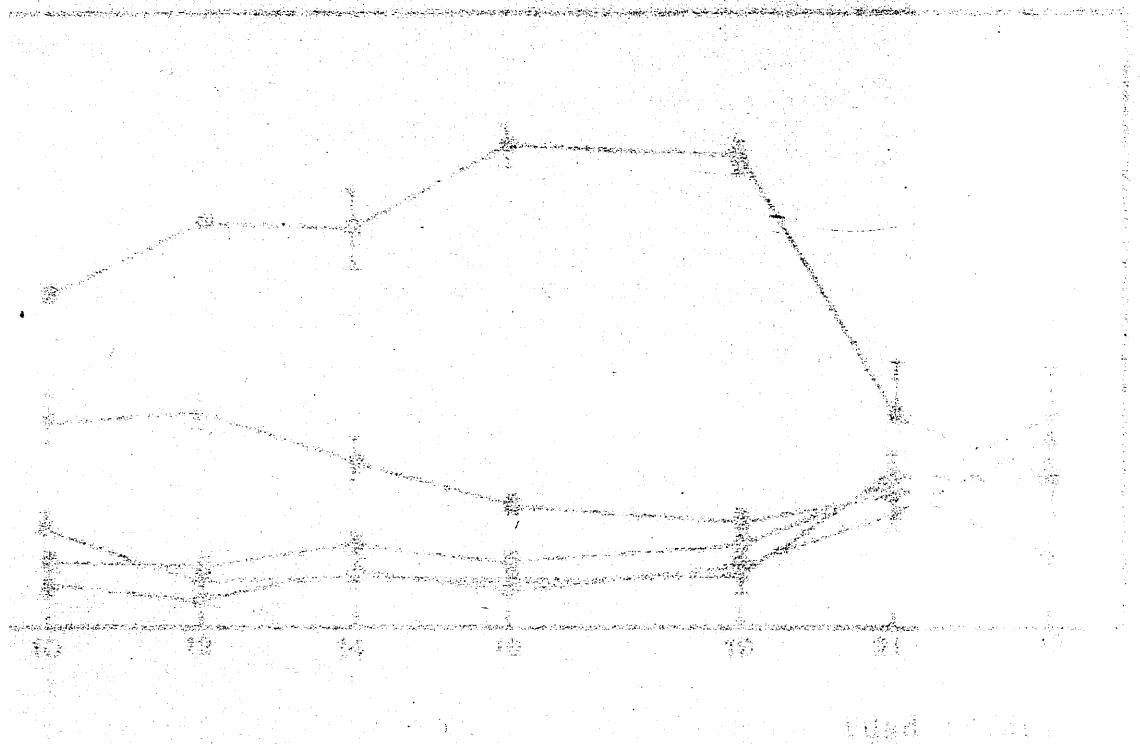
Fig. 49. Variación en el porcentaje de incorporación de $1-^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos insaponificables en hígado de pollo durante el período perinatal. Los resultados son media de al menos cuatro determinaciones \pm S.E.M. (★)escualeno; (▲) ubiquinona; (*) lanosterol; (■) colesterol; (●) no identificado.

La publicación en 1931 del libro "Enzymology" (277) marcó el primer hito de importancia en la historia de la bioquímica de la enzimas a una ciencia. En este libro Needham definió e interpretó los cambios también conocidos en la composición química de los enzimas cuando sus bases químicas estaban aún muy lejos de ser definidas, pero por vez primera de una manera potente. La idea central de los enzimas como responsables de la actividad orgánica. Sin embargo, aún en la década de los 30 se discutía si la cantidad de una enzima o su actividad en "in vivo" eran aspectos importantes en el proceso de adaptación. Los estudios sobre los mecanismos de adaptación en los organismos, iniciados por Knox (278) contribuyeron al desarrollo de la resolución práctica de esas aparentes contradicciones. Se comenzó a darse más énfasis al que las enzimas controlan la cantidad de enzimas en relación a la edad y el desarrollo constituyen un sistema urinario, "gross control" mientras que las fluctuaciones en la actividad enzimática representan de un "fine control" en el organismo. Control mucho más...

Los tipos de enzimas que se encuentran en los tejidos actúan como catalizadores de las reacciones químicas que ocurren en el organismo. Al participar en estas reacciones, las enzimas aceleran el curso de las reacciones químicas que ocurren en el organismo que de otra manera serían muy lentas. Las enzimas que se encuentran en los tejidos actúan como catalizadores de las reacciones químicas que ocurren en el organismo. Al participar en estas reacciones, las enzimas aceleran el curso de las reacciones químicas que ocurren en el organismo que de otra manera serían muy lentas.

V.- DISCUSION

El estudio de las enzimas es una rama de la bioquímica que se ocupa de la caracterización de las enzimas y de su papel en el metabolismo. Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de las reacciones químicas que ocurren en el organismo. Al participar en estas reacciones, las enzimas aceleran el curso de las reacciones químicas que ocurren en el organismo que de otra manera serían muy lentas. Las enzimas que se encuentran en los tejidos actúan como catalizadores de las reacciones químicas que ocurren en el organismo. Al participar en estas reacciones, las enzimas aceleran el curso de las reacciones químicas que ocurren en el organismo que de otra manera serían muy lentas.



Variación en el porcentaje de incorporación de aminoácidos en el músculo de las ovejas durante el período de crecimiento. Los resultados son medios de al menos cinco animales. (a) Arginina; (b) alanina; (c) ácido glutámico; (d) lisina; (e) no identificada.

discusión - 17

La publicación en 1931 del libro "Embriología Química" (277) marcó el primer hito de importancia en la elevación de la bioquímica de la ontogenia a una ciencia cuantitativa. En este libro Needham tabuló e interpretó los cambios hasta entonces conocidos en la composición química de los embriones y, aunque sus bases genéticas estaban aun muy lejos de ser comprendidas, percibió por vez primera de una manera patente la importancia central de los enzimas como responsables de la evolución de un organismo. Sin embargo, aún en la década de los cincuenta se dudaba si la cantidad de una enzima o su actividad catalítica "in vivo" eran aspectos importantes en el proceso de diferenciación. Los estudios sobre los mecanismos de adaptación enzimática en mamíferos, iniciados por Knox (278) contribuyeron enormemente a la resolución práctica de este aparente dilema. En este sentido comenzó a estar más claro el que las variaciones en la cantidad de enzimas en relación a la edad y al estado fisiológico constituían un sistema primario, "grosero", de regulación mientras que las fluctuaciones en la actividad de una cantidad determinada de una enzima representaban un mecanismo de control mucho más "fino".

Los tipos de enzimas y sus "concentraciones" en cada tejido actúan como factores determinantes de sus potencialidades funcionales. El perfil cuantitativo de las enzimas difiere más fuertemente entre los tejidos adultos completamente diferenciados que entre los correspondientes tejidos fetales, tal como ha sido demostrado en rata. Indudablemente, también en el pollo la ontogenia implica una especialización creciente en los perfiles enzimáticos tisulares. En este aspecto, los trabajos de Olga Greengard y su grupo son dignos de destacar, trabajos llevados a cabo en primer lugar en rata (279) y posteriormente en embrión de pollo (133). En el último de los

trabajos citados se ha intentado recopilar la considerable información existente hasta el momento sobre los cambios de las concentraciones enzimáticas en distintos órganos de embrión de pollo, clasificando las enzimas en los cuatro órganos estudiados (hígado, cerebro, riñón y corazón) sobre la base del estado de desarrollo en que emerjen y estableciendo las comparaciones pertinentes frente a análoga información en órganos de mamíferos en desarrollo. La importancia, universalmente reconocida, del colesterol y la inexistencia de datos sobre las enzimas relacionadas con la biosíntesis de éste nos llevó a estudiarlas de una manera detallada en aquellos órganos que más directamente se han considerado implicados en esta vía metabólica. En animales adultos, el hígado y el intestino son los órganos mayoritariamente responsables de la colesterogénesis (70, 71) aunque también el riñón está siendo considerado en los últimos años como un órgano fundamental en este aspecto, especialmente por su importancia en el metabolismo del ácido mevalónico (177). Sin embargo, si bien la síntesis del colesterol en cerebro adulto es poco significativa, su contribución durante las primeras etapas del desarrollo está hoy fuera de toda duda (88).

Por otra parte, los datos que actualmente se tienen sobre el metabolismo del colesterol y su evolución en distintos tejidos de aves son aún sumamente confusos y hasta contradictorios. Por todo ello, en una serie de trabajos realizados anteriormente en el Departamento, se ha estudiado profundamente la etapa inmediata a la eclosión tanto desde el punto de vista de los cambios en las cantidades de colesterol en tejidos en sus diversas formas de presentarse, como desde la evolución que algunas de las enzimas más directamente implicadas en la regulación de su biosíntesis presentan a lo largo de los

primeros días de vida del polluelo. Los resultados obtenidos en este sentido han sido sumamente interesantes, especialmente los referentes a las actividades enzimáticas del hígado, demostrando el papel que este órgano representa a partir de la reabsorción del saco vitelino. Sin embargo, todos los indicios parecen apuntar a que el cerebro puede desempeñar una función crucial durante el período embrionario, restando importancia en esas condiciones del desarrollo al papel del hígado u otros tejidos. En este sentido, los resultados de la presente Memoria Doctoral que se discuten a continuación confirman plenamente las suposiciones expresadas anteriormente y constituyen una evidente prueba de la relación existente entre los cambios de las actividades de algunos enzimas "clave" y las variaciones paralelas en la biosíntesis y acumulación de colesterol.

Evolución del contenido en colesterol a lo largo del desarrollo embrionario.

En la primera parte de esta Memoria Doctoral se efectúa un análisis de los niveles de colesterol en diferentes órganos del embrión del pollo durante la segunda mitad del período de incubación, etapa que coincide prácticamente con la finalización del proceso de proliferación neuronal en el tejido nervioso del embrión y el inicio del subsiguiente proceso de mielinización.

Son escasos los datos que se poseen en la actualidad sobre la cantidad de esteroides presentes en los distintos órganos del embrión de pollo. Es conocido el hecho de que la cantidad total de esteroides sufre un incremento de forma gradual a lo largo del desarrollo embrionario y que el incremento en los niveles de colesterol sigue, de manera casi uniforme, el

aumento en peso seco del embrión.

Los resultados encontrados muestran que las variaciones en el contenido en colesterol, en los diferentes órganos, a lo largo del desarrollo embrionario, ofrecen valores diferentes según se trate de valores absolutos, referidos al órgano completo, o se expresen de modo relativo, en función de una unidad de peso. Estas diferenciaciones resultan lógicas en base al gran incremento en peso total que sufren los diversos órganos estudiados durante la etapa de desarrollo.

En términos absolutos, los resultados han mostrado un incremento apreciable en la cantidad de colesterol durante el desarrollo embrionario en todos los órganos analizados, incremento que resulta especialmente llamativo para el colesterol hepático que llega a alcanzar, en las etapas finales del desarrollo, niveles cien veces superiores a los existentes inicialmente. Para el caso del cerebro o del riñón los incrementos, aunque igualmente apreciables, resultan mucho menos llamativos, detectándose, al final del período de incubación, cantidades de colesterol del orden de 5 mg ó 0.1 mg respectivamente, valores muy por debajo de los 56 mg de este compuesto que pueden obtenerse del hígado embrionario. Los resultados encontrados, en este aspecto, están plenamente de acuerdo con el incremento en la cantidad total de colesterol mostrada por el embrión a lo largo del desarrollo.

Pero son sin duda los análisis sobre las variaciones relativas de los niveles de colesterol en los distintos órganos (cuando aquéllos se expresan como mg de compuesto por cada 100 mg de peso fresco), los que ofrecen resultados más específicos y sumamente interesantes. Así, en cerebro, la concentración relativa de colesterol encontrada al final de la

etapa de desarrollo embrionario es realmente el doble de la existente en dicho órgano durante los primeros días de incubación. En riñón el incremento en colesterol durante el desarrollo es debido, prácticamente en su totalidad, al incremento en peso sufrido por el órgano, lo que se manifiesta en que las concentraciones de dicho compuesto se mantengan casi constantes durante el período de incubación, aunque se detecte el incremento mencionado anteriormente en la cantidad absoluta de colesterol como resultado del crecimiento del órgano.

El hígado, en este aspecto, ofrece unos resultados muy llamativos y claramente diferentes a los ofrecidos por los dos órganos antes mencionados. Efectivamente, la concentración de colesterol encontrada en hígado al final del período de incubación resulta ser unas 12 veces superior a la observada en el día 10 de desarrollo embrionario. Ello refleja que durante la etapa de incubación el incremento en los niveles de colesterol en este órgano no son sólo el reflejo de un lógico aumento en peso sufrido por el hígado, sino que éste realiza a lo largo del desarrollo embrionario un proceso activo de acumulación de colesterol, incrementando paulatinamente su concentración.

Al objeto de profundizar en la valoración de las variaciones antes comentadas y debido al diferente papel fisiológico que desempeña el colesterol según se encuentre en forma libre o esterificada, se llevó a cabo la determinación de los niveles que mostraban cada una de estas formas de colesterol en las diferentes etapas de desarrollo de cada uno de los órganos anteriormente analizados.

Los resultados encontrados han sido de sumo interés revelando un comportamiento diferencial, en este aspecto, entre los distintos órganos que refleja peculiaridades

propias de cada uno. En el caso del cerebro y del riñón, los incrementos detectados en cada caso para los niveles de colesterol durante la incubación son debidos, prácticamente en su totalidad, a un aumento de colesterol libre en los respectivos órganos, no presentando el colesterol esterificado cambios apreciables durante el desarrollo.

El comportamiento del hígado, en este aspecto, es claramente diferente. El espectacular incremento de colesterol en este órgano durante la incubación es debido fundamentalmente a una acumulación de colesterol esterificado y aunque el colesterol libre también aumenta algo en el hígado a lo largo de estas etapas, no lo hace ni mucho menos de una forma tan llamativa ni puede considerarse como el responsable de las variaciones mostradas por el colesterol total en este órgano.

Los resultados encontrados sobre los valores relativos de colesterol libre y esterificado en los diferentes órganos ha mostrado que tanto en cerebro como en riñón, durante toda la etapa de desarrollo embrionario, es el colesterol libre el que se incrementa en una mayor proporción, si bien existe un comportamiento algo distinto de estos dos órganos. Así, en el cerebro la concentración de colesterol libre no sólo es mayor que la de esterificado durante todo el período de incubación, sino que incluso aumenta aproximadamente un 10% a lo largo del desarrollo embrionario. En el riñón, por el contrario, la proporción de colesterol libre, superior siempre a la de esterificado, tiende a mantenerse constante durante el período de incubación o incluso a decrecer algo en las etapas finales del proceso.

En el hígado, aunque durante las etapas iniciales del desarrollo el mayor porcentaje de su colesterol se encuen-

tra en forma libre, va a suceder un proceso de inversión en estas proporciones, aproximadamente en torno al día 12 de incubación, como resultado de la importante acumulación de colesterol esterificado que va realizando el órgano a lo largo del desarrollo. Como resultado de este proceso, al final del período de incubación el colesterol esterificado supondrá aproximadamente el 90% del colesterol total hepático, frente al 40% que representaba en las etapas iniciales.

Los resultados encontrados en cerebro son de particular importancia en relación con el proceso de mielinización. El aumento observado en los niveles de colesterol durante la etapa de mielinización activa es similar al encontrado en rata durante el mismo período (92), confirmando la necesidad de colesterol en el proceso de formación de las vainas de mielina. Aunque en el pollo recién nacido se ha observado un ligero aumento en los niveles de colesterol del cerebro (100), este incremento es muy inferior al que sucede durante la etapa de incubación, corroborando el hecho de que la mielinización, en el caso del pollo, sucede durante el desarrollo embrionario, culminando probablemente en los primeros días de vida postnatal. Por otra parte, que el incremento observado sea debido básicamente a un aumento en colesterol libre (tanto en valores absolutos como relativos) es una indicación de la procedencia de este colesterol a partir de una síntesis endógena más que de fuentes dietarias.

El hecho de que el colesterol esterificado en cerebro de embrión de pollo sufra una disminución en su proporción relativa a lo largo del proceso de mielinización, está de acuerdo con los resultados encontrados en mamíferos donde se observa la presencia de ésteres de colesterol en cerebro durante el proceso de mielinización (103), mientras que en el

cerebro del animal adulto sus niveles son mínimos. La escasa presencia de colesterol esterificado en el momento de la eclosión se mantiene en el cerebro del pollo hasta el día 15 de vida postnatal (100).

Se ha sugerido que la forma esterificada del colesterol sería incorporada a la vaina de mielina en momentos iniciales del desarrollo, cerebral, siendo hidrolizado con posterioridad y transformado en colesterol libre. Se piensa que la detección de los ésteres de colesterol resultaría, por otra parte, dificultada en el cerebro del animal adulto debido a su enmascaramiento por los lípidos que en grandes cantidades aparecen acumulados en el órgano durante estas etapas.

El embrión de aves es un sistema cerrado que depende, para su desarrollo, de la toma de material de origen materno almacenado en el huevo. Durante las etapas iniciales de desarrollo la proliferación celular es extremadamente intensa produciéndose, por tanto, una gran demanda de diversos componentes de membrana, para atender a los procesos de síntesis de estas estructuras que resultan necesarias para las divisiones celulares. Para abastecer la demanda de lípidos en estas etapas debe existir una síntesis de novo a partir de reservas no lipídicas o una movilización de lípidos almacenados.

Los lípidos en el embrión de pollo están almacenados en la yema, donde se encuentra además gran parte de sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo del embrión. Actualmente existe una gran controversia sobre si durante el desarrollo embrionario se produce, o no, síntesis lipídica endógena en los tejidos del embrión o bien en el momento de la eclosión el colesterol del embrión procede de sus reservas lipídicas, movilizadas durante el desarrollo.

Tsuji y otros (32) estudiando los niveles de colesterol libre y esterificado en el huevo en incubación, no han encontrado evidencias de una síntesis activa en los tejidos embrionarios, postulando que el colesterol de la yema es esterificado y transferido al embrión durante la etapa de desarrollo embrionario. Budowski, por el contrario (280) indica que al menos en ciertos tejidos del embrión, entre ellos el cerebro, debe producirse una síntesis endógena de colesterol durante determinadas etapas del desarrollo embrionario.

Los resultados encontrados en el hígado inciden también sobre esta misma problemática. En este aspecto, el enorme aumento de los niveles de colesterol en este órgano, basado fundamentalmente en una acumulación de colesterol esterificado, apoya fuertemente la idea de una movilización, previa esterificación, del colesterol a partir de las reservas lipídicas. El alto porcentaje de colesterol esterificado en los lípidos de los quilomicrones y lipoproteínas del plasma embrionario (35) sugiere que el colesterol sería transportado desde el saco vitelino hasta el embrión, siendo posteriormente almacenado en el hígado para ser usado por el resto de los tejidos y órganos embrionarios en función de las necesidades específicas de cada uno de ellos.

Estos hechos se encuentran, por otra parte, en consonancia con la brusca disminución del contenido de colesterol (fundamentalmente de colesterol esterificado) observada en el hígado de pollos recién nacidos (100), puesto que, tras la eclosión, el animal pasa de una alimentación rica en lípidos a una dieta con un bajo contenido lipídico, cesando el trasvase de colesterol esterificado al hígado. Ello trae consigo una disminución en el contenido hepático de colesterol esterificado, de tal forma que en el animal adulto el porcentaje

de este compuesto representa sólo un 5-10%. Por lo tanto, se puede sugerir que esta enorme acumulación de ésteres de colesterol es un fenómeno propio del desarrollo embrionario que quizás ayude al animal recién nacido a adaptarse a sus nuevas condiciones alimenticias tras la eclosión.

El caso del riñón es, en cierto modo, semejante al del cerebro ya que también en riñón el incremento en colesterol es debido fundamentalmente al colesterol libre, lo que parece indicar que en este órgano se produciría un proceso de síntesis endógena, con la salvedad de que en riñón el incremento en los niveles de colesterol es inferior al mostrado por los otros dos órganos anteriormente comentados.

Variaciones en la actividad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del MVA

Según diversos autores, los carbohidratos representan la mayor fuente de energía del embrión durante la primera semana de incubación y las proteínas durante la segunda. En el último tercio de la incubación son los lípidos, sin embargo, quienes procuran el abastecimiento energético del embrión.

Poco es conocido sobre los enzimas que determinan en este caso la tasa de utilización de lípidos en el embrión durante estos períodos que coinciden, ya de lleno, en el proceso de mielinización. Parece probable que el proceso inverso, lipogénesis, sólo llegue a ser relevante en el pollo tras la eclosión, cuando ya el organismo cambia a una dieta rica en hidratos de carbono con una disminución en el contenido de grasas.

Es bastante probable que la presencia de esta dieta lipídica en las últimas etapas del desarrollo esté relacio-

nada de forma directa con la adecuada culminación del proceso de mielinización que se está llevando a efecto. En este aspecto resulta interesante constatar algunas correspondencias entre el desarrollo embrionario del pollo y el de algunos mamíferos, como la rata, cuyo proceso de mielinización resulta muy semejante al humano.

A pesar de la duración similar de la incubación en el pollo y la gestación en la rata, el proceso de eclosión en aves sería similar, en algunos aspectos, a la etapa de destete en la rata y no a su nacimiento. Efectivamente, la dependencia lipídica del embrión de pollo durante la última semana de incubación es similar a la dieta de la rata recién nacida a partir de la leche materna, coincidiendo esta dieta, igual que ocurría en el pollo, con la etapa de maduración de la mielina, que en la rata se completa después del nacimiento. Destete y eclosión son similares, así, en el sentido de que ambos procesos están asociados con la transición desde una dieta rica a grasas a una con bajo contenido en ellas, al tiempo que culmina el proceso de mielinización.

Un significativo número de enzimas parece emerger en el cerebro de pollo antes de la eclosión y en la rata tras el nacimiento. Estos enzimas parecen ser similares en ambos casos, coincidiendo ambas etapas, igualmente, en la puesta en marcha de una serie de rutas metabólicas equivalentes. El estudio de estas correlaciones puede representar un instrumento útil para afirmar o no el papel fisiológico sospechado de tales mecanismos enzimáticos en el proceso de mielinización.

Se ha observado, mediante inyección en el saco vitelino de precursores marcados radiactivamente (281), que el sistema enzimático que convierte el MVA en colesterol parece

funcionar en el embrión de pollo ya desde el día sexto de incubación. Sin embargo, la importancia de este mecanismo enzimático no resulta clara, fundamentalmente después de comprobar la dependencia lipídica del embrión de pollo.

En preparaciones de hígado de ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol se ha demostrado una inhibición parcial de la conversión de MVA a farnesil-PP y colesterol, así como en la de farnesil-PP a escualeno. Ello llevó a postular la existencia de puntos secundarios de control de la colesterogénesis situados entre MVA y farnesil-PP y en algún paso posterior (probablemente en la conversión de este último a escualeno), aunque estos lugares secundarios de control tienen, probablemente, menor importancia como puntos de control que el que posee la HMG-CoA reductasa.

Con objeto de determinar la importancia cuantitativa del sistema enzimático implicado en la fosforilación y descarboxilación del MVA en cerebro, hígado, intestino y riñón de embrión de pollo, se ha realizado la segunda parte de esta Memoria donde se han determinado las variaciones de dichas actividades enzimáticas a lo largo del desarrollo.

Los resultados obtenidos en cerebro confirman, de nuevo, la importancia del proceso de colesterogénesis durante el período de mielinización. Así, a pesar de que la actividad pirofosfomevalonato cinasa no varía de forma notoria durante el desarrollo embrionario, la mevalonato cinasa aumenta sus niveles de actividad de forma acusada durante la tercera semana de incubación. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en trabajos anteriores realizados en este Departamento (259) donde se ha indicado una disminución de la actividad mevalonato cinasa desde el día 3 al 6 de vida postnatal, mientras que la fosfomevalonato cinasa tampoco en es-

te caso muestra variones acusadas.

El hecho de que la actividad mevalonato cinasa en cerebro sea francamente elevada durante el período de mielinización activa sugiere que esta enzima posee un comportamiento paralelo a la biosíntesis de colesterol durante el desarrollo, haciendo pensar que pueda tener importancia en dicho proceso.

La pirofosfomevalonato descarboxilasa presenta, igualmente, durante el desarrollo embrionario un aumento muy acusado en su actividad, sobre todo a partir del día 13, aumento que continúa hasta el día 18-19 de desarrollo, donde aparece una meseta de actividad máxima, para disminuir a partir de este momento. El aumento en la actividad observado a partir del día 13 se corresponde con el incremento más rápido en los niveles de colesterol libre en cerebro, tanto en forma absoluta como relativa, detectado a partir de este día. En el pollo ya nacido (264) se ha demostrado que la actividad se mantiene o incluso disminuye algo, a lo largo de la edad.

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta el hecho de que la actividad específica de la descarboxilasa es mucho menor que la de la fosfomevalonato cinasa y mevalonato cinasa es razonable sugerir que la descarboxilación del PPMVA juega, en el embrión de pollo, un papel regulador en la síntesis cerebral de esteroides, al igual que en el cerebro de ratas en desarrollo (257).

En el caso del hígado ni la actividad mevalonato cinasa ni la fosfomevalonato cinasa sufre grandes variaciones a lo largo del desarrollo embrionario. En este órgano, la actividad descarboxilasa ha mostrado ser bastante inferior a la existente en cerebro, incluso disminuyendo hacia el final

de la incubación hasta casi la mitad de los valores iniciales. Aunque en pollo se ha demostrado un aumento en la actividad mevalonato cinasa a partir del día 6 de vida postnatal (260), una vez el animal se alimenta exclusivamente con una dieta de bajo contenido lipídico, en rata no se han observado variaciones en la actividad de estas enzimas tras el destete (261).

La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa hepática ofrece, por el contrario, un típico patrón de desarrollo durante el período postnatal. Así, la actividad es muy inferior en ratas recién nacidas que en ratas destetadas (261). Este aumento de actividad ha sido achacado al cambio dietario que acompaña al destete. En efecto, dado que la leche de rata contiene colesterol, se ha sugerido que éste podría actuar inhibiendo la actividad descarboxilasa hepática durante la lactancia.

También en pollo (264) se ha observado un gran aumento en la actividad descarboxilasa a los 5 días tras la eclosión, incremento que es igualmente explicado en base a los factores nutricionales a que están expuestos los animales, ya que es precisamente hacia el 4º día de vida postnatal cuando el saco vitelino reabsorbido ha desaparecido totalmente, alimentándose el animal, desde este momento, a expensas de una dieta con bajo contenido lipídico. Parece, por lo tanto, lógico suponer que en el caso del embrión de pollo la baja actividad descarboxilasa detectada en hígado es debida fundamentalmente al gran aporte lipídico procedente de la yema, así como al gran contenido en colesterol del órgano que podría igualmente actuar inhibiendo a la descarboxilasa.

En el caso del intestino la actividad mevalonato

cinasa muestra una clara disminución desde el día 13 al 16 de desarrollo embrionario. La actividad fosfomevalonato cinasa, por el contrario, no varía de forma muy acusada, e incluso aumenta algo durante los primeros días de estudio. Los niveles de actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa, que el día 10 de incubación eran mínimos, aumentan de forma patente hacia el día 14, manteniéndose en niveles más elevados a partir de este momento.

Los datos bibliográficos existentes sobre este órgano, en cuanto a las enzimas estudiadas, son mínimos, aunque parece ser que, en el caso del pollo (264), ninguna de las tres enzimas sufre cambios en su actividad a lo largo de la edad. Estos datos parecen indicar la independencia de tales enzimas respecto al colesterol procedente de la yema en el intestino de pollo durante el desarrollo embrionario y en etapas inmediatas a la eclosión.

En cuanto al riñón, el estudio efectuado indica que las actividades enzimáticas responsables de la fosforilación del ácido mevalónico no son muy variables, manteniéndose dentro de estrechos límites. La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa, por el contrario, sufre una disminución a partir del día 15 de desarrollo embrionario, manteniéndose a partir de este momento en niveles inferiores a los existentes en etapas anteriores. También en este órgano son escasas las investigaciones realizadas hasta el momento a pesar de la importancia del riñón en el metabolismo del MVA (177).

Durante el período postnatal la actividad mevalonato cinasa ha mostrado una disminución hacia el día 4-6 (259), mientras que la actividad descarboxilasa se mantiene en niveles poco variables (264). Los niveles de actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa son, durante el período embriona-

rio, superiores a los existentes tras la eclosión. Por lo tanto es lógico suponer que durante el período embrionario el riñón debe actuar más eficientemente que tras la eclosión en el metabolismo del MVA, bien por la ruta de biosíntesis de esteroides o bien mediante su metabolización por la ruta no conducente a esteroides.

Incorporación de 2-¹⁴C-MVA

El siguiente paso en este trabajo ha tenido por objeto determinar las posibles diferencias en la capacidad de biosíntesis de colesterol por el cerebro, hígado, intestino y riñón de pollo durante el desarrollo embrionario e inmediato a la eclosión. Para ello se han realizado una serie de experiencias de incorporación "in vitro" de MVA a lípidos insaponificables por los cuatro órganos embrionarios. Por otra parte se ha procedido a la separación e identificación de distintos compuestos insaponificables a partir de lípidos totales. Asimismo teniendo en cuenta la posible funcionalidad del "shunt" que conduce a la síntesis de compuestos no esteroídicos se ha determinado el desprendimiento de ¹⁴CO₂ producido como consecuencia del "shunt".

Tanto en el caso del cerebro como del hígado no se ha observado desprendimiento de ¹⁴CO₂ como consecuencia del "shunt", lo que indica claramente la no funcionalidad de esta ruta metabólica en ambos órganos durante el período embrionario. El intestino y riñón han mostrado, en este aspecto, un comportamiento semejante a lo largo del período embrionario. Así, el CO₂ desprendido como consecuencia del "shunt" es bastante elevado, siendo algo superior en el caso del intestino. Estos resultados indican la funcionalidad de la ruta metabólica de utilización de MVA no conducente a esteroides

en riñón e intestino embrionarios, al igual que ocurre en el caso del riñón de rata (117) y la inexistencia de ella en cerebro e hígado embrionarios.

La incorporación "in vitro" de 2-¹⁴C-MVA por el cerebro embrionario ha mostrado realizarse a una velocidad elevada y constante durante los días 10-19 de desarrollo embrionario, presentando un descenso acusado entre este último día y el segundo tras la eclosión. Algunos autores (118,219) han indicado la ventaja de expresar la actividad enzimática HMG-CoA reductasa o las tasas sintéticas en cerebro durante el período de desarrollo referidas al órgano completo, ya que de este modo se elimina la posible distorsión de los datos producida por cambios en el contenido de agua o en la acumulación de proteínas.

Nuestros resultados, mediante esta forma de expresión, indican que la capacidad de utilización de MVA por el cerebro embrionario completo aumenta de forma muy notable hasta el día 19 de incubación, período que coincide con la mielinización activa. El aumento observado en la incorporación de MVA a lípidos insaponificables totales se corresponde con un incremento en el contenido de colesterol libre en cerebro completo que aumenta de forma notable desde el día 10 al 19 de desarrollo embrionario. En este sentido, también se ha mostrado, en ratón (118), un aumento importante en la incorporación de 2-¹⁴C-MVA durante el período que coincide con la mielinización, indicando la necesidad de una elevada actividad sintética.

Cuando se examina el porcentaje de radiactividad localizada en los distintos lípidos insaponificables respecto al total, se observa que la incorporación se realiza fundamentalmente a lanosterol desde el día 10 al 16, de tal forma

que supone más del 30% de la radiactividad incorporada a lípidos insaponificables totales. Hacia el final de la incubación disminuye la incorporación de lanosterol mientras que aumenta de forma similar la incorporación al compuesto no identificado.

El porcentaje de incorporación a colesterol se mantiene siempre próximo al 20% mientras que, a lo largo de la incubación, la incorporación a demosterol disminuye hasta ser la mitad de la que existía el día 10. Esta disminución está de acuerdo con las observaciones de la existencia de desmosterol en etapas iniciales del desarrollo del cerebro (93, 94, 95), así como con el aumento en la actividad demosterol reductasa (97) que llevaría consigo la disminución en la concentración de desmosterol en cerebro, sugiriendo que el desmosterol puede jugar un papel importante como precursor del colesterol durante el proceso de mielinización.

En el caso del hígado la incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C}$ MVA a lípidos insaponificables es mayor que la observada en cualquiera de los otros órganos independientemente de la edad considerada si bien tiende a disminuir de forma notable desde el día 12 a 2 días tras la eclosión. La representación gráfica de estas variaciones es semejante a la que se obtiene representando el porcentaje relativo de colesterol libre durante el período embrionario ya que en ambos casos se observa una clara disminución desde el día 12 hasta el final de la incubación.

Cuando analizamos la incorporación a lípidos insaponificables totales en el hígado completo se observa, según era de esperar debido al gran aumento en peso del órgano, un claro incremento en la incorporación durante todo el período embrionario. También en este caso se aprecia una corres-

pondencia entre este aumento y el que experimenta el colesterol libre del hígado a lo largo de la incubación que se incrementa desde valores de 0.16 mg hasta 3 mg en el momento de la eclosión. Que este aumento en el contenido en colesterol libre y hepático sea el resultado de una síntesis endógena en el propio órgano o bien proceda del colesterol esterificado, tomado de la yema e hidrolizado en el hígado no se puede resolver con los datos que poseemos actualmente. De todas formas la elevada incorporación de MVA existente en este órgano indica claramente que al menos la secuencia enzimática responsable de la utilización de MVA existe en el hígado embrionario, pero la determinación de si es o no funcional en las condiciones "in vivo" requeriría estudios específicos en este sentido.

Cuando se examina la incorporación de 2-¹⁴C-MVA a colesterol se comprueba que la representación gráfica es, en cierto modo, semejante a la observada para los totales así como para la variación en el porcentaje de colesterol libre en hígado aunque en este caso la disminución observada a partir del día 14 es muy brusca manteniéndose a partir de entonces en niveles muy bajos. Es también de resaltar el gran aumento en la incorporación a ubiquinona desde el día 12 al 19. Estos hechos se aprecian también claramente cuando se analiza el porcentaje de incorporación de MVA a los distintos lípidos insaponificables. En este caso el porcentaje de incorporación a colesterol disminuye desde un 47% hasta un 3% mientras aumenta el de ubiquinona desde un 10% hasta un 58%.

De nuevo en hígado los resultados obtenidos pueden relacionarse con las condiciones nutricionales a que está sometido el pollo durante el proceso embrionario. En ratas, Shah (155) ha observado un aumento en la incorporación de MVA

a la fracción no saponificable tras el destete y ha sugerido que el colesterol de la leche materna puede actuar inhibiendo alguna de las enzimas implicadas en la utilización de MVA. Esto explicaría, en el caso del embrión de pollo -en condiciones de un aporte de colesterol procedente de la yema y movilizado más rápidamente a partir del día 10-12-, la disminución en la incorporación a lípidos insaponificables, que sería debida a la inhibición producida por el colesterol sobre algunas enzimas de esta ruta biosintética. De hecho, como ya se ha indicado, la actividad PPMVA descarboxilasa disminuye a lo largo de la incubación. Más que por el colesterol en sí mismo, la inhibición sería producida por el colesterol en plasma que forma parte de quilomicrones y lipoproteínas al igual que ocurre en cultivo de fibroblastos donde se ha observado una inhibición en la biosíntesis de colesterol a partir de MVA por LDL, inhibición que es superior al 95% (251) mientras que en estas condiciones la incorporación desde este sustrato a ubiquinona aumenta en más de un 100% (205). Esto explicaría, por lo tanto, el aumento observado en la incorporación a ubiquinona y la clara disminución en la incorporación a colesterol tras el día 12 de desarrollo embrionario e indicaría la posible existencia en embrión de pollo, al igual que en fibroblastos, de un mecanismo de control de la biosíntesis de compuestos isoprenoides que actuaría desviando el farnesil-PP formado hacia la síntesis de compuestos no esteroídicos por inhibición de la escualeno sintetasa probablemente.

En cuanto al intestino, a diferencia de los órganos antes mencionados, ha mostrado un aumento en la capacidad de conversión de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables desde el día 10 al 19 de desarrollo embrionario. La incorporación observada es, desde luego, independiente de la actividad MVA

cinasa que disminuye de forma notoria hacia el día 15 de desarrollo embrionario. Sin embargo el aumento en la incorporación puede relacionarse en parte con el de la actividad PPMVA descarboxilasa por lo menos hasta el día 14 de desarrollo embrionario.

Los datos que sobre éste órgano se poseen son mínimos aunque en un trabajo aún no publicado realizado en este Departamento se ha observado una parcial inhibición de la actividad descarboxilasa por efecto de la dieta, aunque no varía a lo largo de la edad. El hecho de que en el embrión de pollo, a diferencia de otras especies (79, 86), el colesterol exógeno no induzca una inhibición en la conversión de MVA y por lo tanto posiblemente tampoco de los enzimas implicados en su utilización es de difícil explicación. Se puede apuntar como posibilidad el que en el animal nacido el colesterol dietario ingiera directamente en el lumen intestinal donde actuaría de forma directa sobre las células de la mucosa responsable de la síntesis de colesterol, mientras que en el embrión de pollo el colesterol procedente de la yema es reabsorbido y transportado vía circulación vitelina y no se produce, por lo tanto, ingreso en el lumen intestinal con lo cual su efecto sobre la mucosa podría no ser tan patente ni tan rápido como en el caso del hígado.

Cuando se examina la radiactividad incorporada a distintos lípidos insaponificables se aprecia que el mayor porcentaje corresponde al colesterol desde el día 10 al 14 disminuyendo a partir de este momento, mientras que en la misma etapa aumenta el porcentaje de incorporación al compuesto no identificado. Es de hacer notar que precisamente el aumento más patente se localiza entre el día 19 y 21 en donde se ha observado precisamente una disminución en la incorporación a coles-

terol. Esto podría indicar, en cuanto a la identidad de este compuesto que debe ser precursor del colesterol más que producto de su metabolismo, puesto que se acumula en condiciones en donde parece haberse producido inhibición de algunas de las enzimas implicadas en la utilización de MVA, como lo indica la disminución observada en la incorporación de este sustituto a lípidos insaponificables totales.

En el caso del riñón se ha obtenido una elevada incorporación de 2-¹⁴C-MVA a lípidos insaponificables los primeros días de estudio, incorporación que supera a la observada para el cerebro o intestino los mismos días de desarrollo. En cuanto al patrón de desarrollo seguido por este órgano se aprecia un aumento notorio en la incorporación de MVA desde el día 11 hasta el 14 para disminuir de forma acusada hasta el final del período de incubación. Este patrón de desarrollo puede relacionarse con el observado en la actividad PPMVA descarboxilasa que aumenta también de forma considerable durante los días 11-14 de desarrollo. La elevada capacidad de utilización de MVA mostrada los primeros días de estudio inciden en confirmar la importancia de este órgano en el metabolismo del MVA durante el desarrollo embrionario.

Cuando la velocidad de incorporación se expresa referida al órgano completo aumenta tan sólo hasta el día 16 de incubación e incluso disminuye un poco hasta el momento de la eclosión. Los niveles de incorporación mediante esta forma de expresión son mucho menores que los obtenidos para el cerebro o el hígado, lo que es lógico teniendo en cuenta el pequeño peso del riñón durante el período embrionario.

Es interesante observar que la representación gráfica de la incorporación de MVA a colesterol es prácticamente

igual a la que se obtiene de la incorporación a lípidos totales con un máximo el día 14. Esto se observa igualmente cuando se representa el porcentaje de incorporación a colesterol mientras que la representación del porcentaje de incorporación de MVA al compuesto no identificado tiene un perfil prácticamente invertido respecto al de colesterol.

Se ha indicado (117) que en riñón de rata la mayor parte del MVA metabolizado se incorpora a escualeno (65%) y lanosterol (21%). En nuestro caso el porcentaje de incorporación a ambos precursores es muy inferior y nuestros datos están más de acuerdo con los obtenidos por Wiley y col (177) que detectan un 9% en lanosterol y 15% en escualeno.

Evolución de la HMG-CoA reductasa

Nuestros resultados muestran que la HMG-CoA reductasa en cerebro presenta niveles de actividad muy superiores a los existentes en el resto de los tejidos estudiados. Así, la actividad en el cerebro es unas 15-20 veces superior a la existente en el hígado, intestino o riñón embrionario.

A pesar de lo esperado, en base a los resultados obtenidos en cuanto a la actividad descarboxilasa, no se ha observado un incremento notable en la actividad reductasa específica a lo largo del desarrollo, sino que el cerebro no presenta variaciones apreciables en esta actividad durante el período estudiado. Cuando la actividad reductasa se expresa como actividad total referida al órgano completo, aparece de nuevo un claro incremento desde el día 8 al 19 de desarrollo embrionario que desciende más tarde a niveles inferiores según cabía esperar en base al gran aumento en el contenido en colesterol libre en este período. Esto es un hecho similar

al que sucede en el cerebro de rata mediante esta forma de expresar la actividad enzimática (219).

Los resultados que se han obtenido en ratas y ratones, en cuanto al cambio de la reductasa con la edad, son un tanto contradictorios si bien coinciden en confirmar la existencia de una elevada actividad en cerebro durante el período de mielinización, actividad netamente superior a la observada en cerebro de animales adultos (118, 215, 216, 219). Son varios los autores que coinciden en afirmar que durante el desarrollo del cerebro la medida de la actividad enzimática total en éste, puede proveer una información mas válida de los cambios de esta enzima a lo largo del desarrollo que la de la actividad específica (118, 219). De hecho, en cerebro de rata, mientras que la actividad específica disminuye desde el día 4º de vida postnatal hasta el adulto, la actividad total en cerebro indica un aumento entre los días 4 y 11 de desarrollo, etapa que coincide con una acumulación masiva de colesterol durante el período de mielinización activa.

Todos los estudios efectuados durante la etapa de desarrollo confirman la independencia del cerebro respecto del colesterol de la dieta. Así, en pollo se ha observado que la actividad reductasa de cerebro es muy elevada durante los primeros 4 días de desarrollo postnatal (etapa en la que aún el pollo se alimenta de la yema residual reabsorbida), no viéndose afectada por adición de colesterol exógeno a la dieta (154). También en rata se ha observado la inaccesibilidad del colesterol de la dieta a la actividad reductasa cerebral de tal forma que esta no varía tras el cambio nutricional que acompaña al destete (219).

Todos estos hechos son perfectamente compatibles con nuestros resultados puesto que la actividad específica reductasa detectada, aunque poco variable, es muy superior a la existente en el animal ya mielinizado y por lo tanto con una menor necesidad de síntesis de colesterol lo que indica la elevada funcionalidad de la ruta de biosíntesis de colesterol durante el desarrollo del cerebro al mismo tiempo que la no inhibición de la actividad reductasa cerebral por el colesterol exógeno procedente de la yema.

En hígado la actividad reductasa ha mostrado ser muy inferior a la observada en cerebro y también como en éste, sin variaciones acusadas durante el desarrollo embrionario aunque se detecta incluso una disminución en los niveles de actividad al acercarse el momento de la eclosión. Una vez finalizado el desarrollo embrionario y según era de esperar por resultados anteriores obtenidos en este Departamento (223), la actividad comienza a aumentar de forma brusca a partir del 20 día tras la eclosión.

Una vez más los resultados obtenidos en hígado han de relacionarse con el estado nutricional de animal. Así, en rata (220, 221) se ha encontrado un fuerte incremento en la actividad reductasa tras el destete alcanzándose niveles superiores a los observados en el animal adulto. La baja actividad reductasa durante el período de lactancia, en rata, vendría a coincidir con los resultados obtenidos en esta misma enzima en hígado durante el período embrionario del pollo.

Se ha indicado que existe una correlación inversa entre el contenido en colesterol hepático y la actividad reductasa (222) y por lo tanto la actividad reductasa práctica-

mente nula podría estar relacionada con el enorme acúmulo de colesterol observado en hígado que es muy patente a partir del día 12, aunque tal y como sucede en rata en donde las variaciones en los niveles de actividad reductasa hepática son debidos fundamentalmente a factores dietarios (221), es probable que también en embrión de pollo sea éste el factor involucrado en la baja actividad reductasa.

Los datos que se poseen sobre la actividad HMG-CoA reductasa intestinal en mamíferos son mínimos y se refieren exclusivamente al período en que el animal posee una dieta semejante a la del animal adulto, no existiendo datos en ratas lactantes. En pollo, en un estudio efectuado sobre la HMG-CoA reductasa intestinal durante el período perinatal (223) se ha puesto de manifiesto también, al igual que en hígado, un aumento en los niveles de actividad a partir del día 4 de desarrollo si bien mucho menos acusado que en éste, probablemente debido a que el colesterol actúa inhibiendo mucho más a la enzima hepática que a la intestinal, aunque de nuestros resultados se puede segerir que la HMG-CoA reductasa intestinal es mucho más sensible que la PPMVA descarboxilasa en este mismo órgano, como lo demuestra el que la actividad de esta última no varíe, como la reductasa, durante el período postnatal.

En cuanto al riñón no nos ha sido posible encontrar datos sobre esta enzima ni durante la vida adulta del animal ni durante su desarrollo. De todas formas como enzima directamente implicado en la utilización de acetato es posible relacionar los estudios efectuados en este aspecto con la actividad de la enzima. Así, se ha observado en el animal adulto que la incorporación de acetato en riñón es prácticamente nula (117, 119). Nuestros resultados confirman que la capacidad de síntesis de colesterol a partir de acetato es mínima,

tanto durante el período embrionario como durante los días inmediatos a la eclosión como lo indica la baja actividad reductasa. Sería necesario efectuar el estudio de los niveles enzimáticos en etapas posteriores de desarrollo del pollo, para determinar si a lo largo de la edad se produce o no un aumento en la actividad reductasa renal, aunque la actividad prácticamente constante observada durante todo el período estudiado tienden a indicar más una dificultad del riñón para la utilización de acetato y confirmar de nuevo la importancia de este órgano en el metabolismo del MVA.

De la comparación de las variaciones en la actividad HMG-CoA reductasa microsomal de cerebro, hígado, intestino y riñón se puede sugerir que la enzima no está regulada de una manera coordinada. Más bien la actividad enzimática parece responder marcadamente a las necesidades fisiológicas de cada tejido respecto a la síntesis de colesterol, lo cual por otra parte, está de acuerdo con el papel fundamental de la enzima en la regulación de la colesterogénesis.

Cambios en el contenido en colesterol y fosfolípidos de membranas microsomales

Teniendo en cuenta el interés que puede presentar el mejor conocimiento de la evolución de los componentes de membranas microsomales con vistas al esclarecimiento del mecanismo por el cual la HMG-CoA reductasa puede verse regulada, se realizó el estudio de la composición lipídica de estas membranas en cerebro e hígado durante el período perinatal. El riñón e intestino no se usaron como material para este estudio debido a la baja actividad reductasa observada en estos órganos y a la poca importancia que esta enzima parece tener en ambos órganos durante el período embrionario.

Los resultados de cerebro muestran que el contenido microsomal de colesterol aumenta de forma apreciable entre el día 8 y 14 de incubación descendiendo, a partir de este momento, hasta niveles semejantes a los iniciales. Como vemos, en este caso el contenido en colesterol microsomal no aumenta durante toda la incubación a pesar del gran aumento en el contenido en colesterol cerebral. Es posible pensar que el cambio observado sea debido a la activa síntesis de colesterol en el cerebro en desarrollo, síntesis que se realiza en parte en las membranas microsomales (103, 114) produciéndose por tanto una acumulación inicial de colesterol y la disminución posterior sería debida a una más rápida movilización de colesterol que ingresaría en la vaina de mielina en formación. Esto explicaría asimismo el aumento observado en los niveles de fósforo lipídico desde el día 10 al 16 y su posterior disminución. Como en el caso del cerebro, la mayor parte del colesterol microsomal se halla en forma libre, y según datos anteriores (154) esta situación se mantiene durante al menos dos semanas tras la eclosión.

Los resultados obtenidos del análisis del colesterol y fosfolípidos totales de extractos lipídicos de membranas microsomales pueden ser expresados en términos de la relación molar colesterol / fósforo lipídico. Esta relación es especialmente importante por reflejar el grado de fluidez de las membranas. Nuestros datos muestran que durante los primeros días de estudio (8-14 días) la relación molar es ligeramente superior a la observada a partir de este momento pero esta variación es mínima. Puesto que tampoco se han observado variaciones en esta relación en el caso de microsomas de cerebro durante las dos primeras semanas tras la eclosión (154), la relación molar y por tanto la fluidez de la membrana no se ve afectada, en cerebro, a lo largo del desarrollo.

El hígado, a diferencia del cerebro, no ha mostrado variación en los niveles de colesterol microsomal durante todo el período de incubación, aunque tras ésta disminuye el contenido en colesterol de forma notable. La mayor cantidad de colesterol en microsomas de hígado durante el período embrionario es posible que sea debida al aporte de colesterol procedente del saco vitelino. A cualquier edad el contenido en colesterol de membranas microsomales es bastante inferior al observado en el caso del cerebro.

El contenido en fosfolípidos totales de microsomas hepáticos, por otra parte, tampoco ha mostrado variaciones notables a lo largo de todo el período estudiado aunque los niveles observados tras la eclosión son ligeramente inferiores a los existentes en etapas anteriores. El contenido en fosfolípidos es también inferior al existente en cerebro durante el mismo período.

En cuanto al contenido en colesterol libre y esterificado de membranas microsomales de hígado se ha observado que, a diferencia de los resultados obtenidos en el órgano completo, el nivel de colesterol libre es superior al de esterificado siendo ésta una característica de las membranas microsomales en condiciones normales ya que esta situación se mantiene incluso durante dos semanas tras la eclosión.

La relación molar, en el caso del hígado no ha mostrado cambios notorios durante el período estudiado, como es lógico debido a la inexistencia de cambios en el contenido de colesterol o fósforo lipídico microsomales. Esta relación es, por otra parte, superior a la observada en cerebro lo que supondría un menor grado de fluidez de estas membranas.

Incorporación de 1-¹⁴C -acetato

La mayor parte de las investigaciones realizadas hasta el momento, en cuanto a la regulación del metabolismo del colesterol se han llevado a cabo mediante la utilización de precursores marcados, con objeto de determinar las tasas absolutas de síntesis de esteroides, o mediante el estudio de la actividad HMG-CoA reductasa que, al menos en hígado, es la enzima que determina la capacidad de biosíntesis de colesterol.

En cuanto a la utilización de precursores marcados, uno de los sustratos usados de forma mas común es el 1-¹⁴C-acetato. Actualmente se está empezando a reconocer que tal método lleva consigo comúnmente una infravaloración de las verdaderas tasas de síntesis (152, 198). El que este método no sea una medida totalmente válida de la capacidad de síntesis es debido fundamentalmente a tres razones (198). Una de ellas sería la tasa de penetración del sustrato a través de la membrana celular. En segundo lugar, según se ha indicado, la activación citosólica del acetato a HMG-CoA sería en realidad una etapa limitante en el caso de este sustrato y finalmente está el hecho de que la actividad específica del sustrato o del acetyl-CoA generado desde éste puede sufrir dilución dentro de la célula. Por lo tanto los resultados obtenidos con este método deben ser interpretados con cierta prudencia.

Por otra parte, también se ha indicado que, al menos bajo ciertas condiciones, no siempre las variaciones observadas en la actividad HMG-CoA reductasa van acompañadas de un cambio paralelo en la capacidad de utilización de acetato (151).

En cuanto a la velocidad de utilización de acetato por el cerebro de pollo durante el desarrollo embrionario e inmediato a la eclosión, los resultados han sido sorprendentes. En efecto, a pesar de que la actividad reductasa no varía a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal, la incorporación de acetato a lípidos insaponificables disminuye durante todo el período estudiado. De hecho también algunos autores (118) han señalado una disociación entre la actividad reductasa en cerebro de ratones recién nacidos y la incorporación de acetato durante el mismo período, de tal forma que mientras se observa una gran disminución en la actividad reductasa, la incorporación de acetato aumenta de forma notable.

Se ha sugerido repetidamente que, en el cerebro de ratas en desarrollo, los cuerpos cetónicos juegan un papel muy importante, siendo usados de forma preferente sobre el acetato (119) y concretamente se ha observado la existencia de un patrón de desarrollo de utilización de cuerpos cetónicos en cerebro. Así, la utilización de aquéllos para la síntesis de esteroides es máxima en el período de mielinización en rata (122, 125) mientras que en pollo la utilización de cuerpos cetónicos por el cerebro es muy superior a la edad de 1 día que a la de 4 o 30 días (134).

En base a estos hechos se puede sugerir que durante el desarrollo del cerebro el acetato puede ser desviado a una ruta no esteroídica, mediante su oxidación a CO_2 en el ciclo de Krebs, abasteciendo al cerebro de la energía que precisa en gran cantidad durante esta etapa, o bien mediante su utilización para la síntesis de ácidos grasos. Los cuerpos cetónicos, por el contrario, serían usados de forma muy eficiente para la síntesis de esteroides.

Por otra parte es también posible que una inhibición en la utilización citosólica del acetato para la formación de HMG-CoA sea la responsable de la disminución observada en nuestro caso. De hecho se ha indicado que la actividad acetoacetyl-CoA tiolasa citoplasmática de embrión de pollo es menor en el momento de la eclosión que en el día 10-12 de desarrollo embrionario, mientras que la actividad de esta enzima en la fracción mitocondrial (implicada en la utilización de cuerpos cetónicos) aumenta considerablemente conforme se acerca el momento de la eclosión (193).

El mayor porcentaje de radiactividad en cerebro desde $1-^{14}\text{C}$ -acetato se ha localizado en colesterol y desmosterol y de ellos sobre todo en colesterol. El porcentaje de incorporación a desmosterol es elevado al comienzo del período estudiado (30%) pero disminuye de forma notable a lo largo de la incubación, llegando a ser de un 10% únicamente. Un aumento paralelo se ha observado en el porcentaje de incorporación a colesterol, que aumenta desde un 35% a un 53%. Por lo tanto es lógico pensar que, puesto que el porcentaje de incorporación al resto de los esteroides no varía de forma acusada, el aumento en la incorporación a colesterol se realiza a expensas de la disminución sufrida por el desmosterol. La disminución observada en el porcentaje de incorporación a desmosterol está de acuerdo con las observaciones de la existencia de niveles relativamente elevados de desmosterol durante el desarrollo del cerebro (93, 94, 95) y sugiere que el desmosterol ha de jugar un importante papel en la regulación de la biosíntesis de colesterol en pollo durante el desarrollo del sistema nervioso, como precursor del colesterol, al igual que ocurre en otras especies (110).

La capacidad de utilización de acetato por el hígado ha resultado ser mínima e incluso disminuir a lo largo del desarrollo embrionario. Esta incorporación tan baja no es sorprendente en vista de las actividades HMG-CoA reductasa observadas durante el mismo período. Como puede verse, los resultados obtenidos en cuanto a la velocidad de incorporación de acetato en hígado son comparables en general con las de la actividad reductasa en éste. En ambos casos las actividades son mínimas e incluso disminuyen un tanto a lo largo del período de incubación. Esto viene a confirmar que en el hígado embrionario la actividad reductasa actúa, al igual que en rata (69, 208), como el punto de control primario de la colesteroogénesis, limitando el abastecimiento de sustrato a la ruta colesteroogénica en condiciones de un gran aporte lipídico (en donde no se precisaría la existencia de una activa sin tesis de colesterol); y de hecho se ha comprobado (223) que a partir del día 4 de vida postnatal se produce un fuerte incremento en la incorporación de acetato a lípidos insaponificables.

En cuanto al porcentaje de incorporación de acetato a lípidos insaponificables, nuestros resultados indican una máxima incorporación a colesterol, que supondría del día 10 al 19 más del 50% de la incorporación total observada. El porcentaje de incorporación al resto de los lípidos insaponificables (mucho menor que el ya indicado a colesterol) aumenta a partir del día 19 de tal forma que los porcentajes de incorporación se hacen semejantes para cada uno de los lípidos. Es curioso que, aunque el funcionamiento de la ruta biosintética en estas condiciones sea mínimo se observe un gran porcentaje de incorporación a colesterol; por lo tanto debe ser suficiente la baja actividad reductasa para suministrar precursores de colesterol, que serán usados fundamentalmente para la síntesis de éste.



En resumen nuestros resultados confirman plenamente la existencia, durante el desarrollo embrionario, de una biosíntesis activa de colesterol en cerebro, como lo indican las elevadas actividades de enzimas implicadas en este proceso durante la etapa de mielinización, así como el acúmulo de colesterol libre detectado durante este período. Por otra parte, el cerebro, a diferencia de los otros órganos estudiados, ha mostrado ser independiente del colesterol procedente del saco vitelino que no inhibe, en dicho órgano, el proceso de colesterogénesis. El resto de los órganos poseen actividades enzimáticas muy inferiores lo que indicaría que, a diferencia del animal adulto, el cerebro contribuye en gran medida a la biosíntesis neta de colesterol en el embrión mientras que la contribución del resto de los órganos sería mucho menor.

1.- Se ha estudiado la evolución del colesterol total, libre y esterificado en cerebro y riñón de embrión de pollo. Al comienzo del período (10 días), el cerebro es el órgano que mayor colesterol presenta, seguido del hígado y del riñón. Durante el desarrollo embrionario, la cantidad de colesterol depositada en los tres órganos aumenta claramente a medida que avanza la eclosión, el acúmulo es muy superior al alcanzándose niveles casi diez veces superiores a los observados en cerebro y de setenta veces a los observados en riñón.

2.- Cuando el colesterol total se refiere a una cantidad de tejido (100 mg), las variaciones se ven más patentes en cerebro y prácticamente inexistentes en hígado, mientras que en el riñón se observan variaciones diez veces superiores a las observadas en cerebro.

3.- Tanto en cerebro como en riñón el porcentaje de colesterol correspondiente al hígado es mayor que el correspondiente al cerebro.

VI.- CONCLUSIONES

El hígado es el órgano que mayor colesterol presenta, seguido del cerebro y del riñón. Durante el desarrollo embrionario, la cantidad de colesterol depositada en los tres órganos aumenta claramente a medida que avanza la eclosión, el acúmulo es muy superior al alcanzándose niveles casi diez veces superiores a los observados en cerebro y de setenta veces a los observados en riñón. Cuando el colesterol total se refiere a una cantidad de tejido (100 mg), las variaciones se ven más patentes en cerebro y prácticamente inexistentes en hígado, mientras que en el riñón se observan variaciones diez veces superiores a las observadas en cerebro. Tanto en cerebro como en riñón el porcentaje de colesterol correspondiente al hígado es mayor que el correspondiente al cerebro.

En resumen nuestros resultados confirman plenamente la existencia, durante el desarrollo embrionario, de biosíntesis activa de colesterol en cerebro, como lo indican las elevadas actividades de enzimas implicadas en este proceso durante la etapa de mielinización, así como el aumento de colesterol libre detectado durante este período. Por otra parte, el cerebro, a diferencia de los otros órganos estudiados, ha mostrado ser independiente del colesterol procedente del saco vitelino que no inhibe, en dicho órgano, el proceso de colesterologénesis. El resto de los órganos muestran actividades enzimáticas muy inferiores lo que indica que, a diferencia del animal adulto, el cerebro contribuye en gran medida a la biosíntesis neta de colesterol en el desarrollo embrionario, que la contribución del resto de los órganos es mínima.

VI. - CONCLUSIONES - - IV

1.- Se ha estudiado la evolución del contenido en colesterol total, libre y esterificado en cerebro, hígado y riñón de embrión de pollo. Al comienzo del período estudiado (10 días), el cerebro es el órgano que mayor cantidad de colesterol presenta, seguido del hígado y del riñón. A lo largo del desarrollo embrionario, la cantidad de colesterol depositada en los tres órganos aumenta claramente si bien en el momento de la eclosión, el acúmulo es muy superior en hígado, alcanzándose niveles casi diez veces superiores a los observados en cerebro y de setenta veces a los observados en riñón.

2.- Cuando el colesterol total se refiere a una misma cantidad de tejido (100 mg), las variaciones son mucho menos patentes en cerebro y prácticamente inexistentes en riñón, mientras que en el hígado se observan en la eclosión niveles diez veces superiores a los observados a los 10 días de incubación.

3. - Tanto en cerebro como en riñón la mayor parte del colesterol corresponde al colesterol libre, mientras que en hígado la mayoría del colesterol se presenta en forma esterificada. El porcentaje de colesterol libre en cerebro se mantiene por encima del 90% a lo largo de todo el desarrollo embrionario, mientras que en riñón este porcentaje oscila entre el 75 y el 90%, con una ligera tendencia a mantenerse durante los últimos días. En hígado el porcentaje de colesterol libre disminuye marcadamente con el desarrollo pasando a ser de un 60 - 50% en los días 10-12 a menos de un 10% en las proximidades de la eclosión.

4.- Las actividades enzimáticas implicadas en la fosforilación del ácido mevalónico presentan niveles semejantes en cerebro, hígado, intestino y riñón de embrión de pollo. La actividad mevalonato cinasa presenta pocas variaciones a lo largo del período de incubación, siendo sólo de destacar un aumento en la actividad en cerebro a partir del día 15 y una disminución entre los días 10-15 de la actividad enzimática en intestino. La actividad fosfomevalonato cinasa no presenta variaciones apreciables durante el desarrollo embrionario.

5.- La actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa se mantiene en niveles muy bajos en los órganos mencionados sin variaciones significativas en hígado e intestino a lo largo del período estudiado. Sin embargo, la actividad descarboxilasa de cerebro aumenta claramente desde el día 13 al 18-19, disminuyendo posteriormente, mientras que la enzima de riñón es máxima entre los días 12 y 16, disminuyendo también en las proximidades de la eclosión. En cualquier caso, la actividad PPMVA descarboxilasa es muy inferior a la PMVA cinasa y ésta a su vez, inferior a la MVA cinasa.

6.- Se ha estudiado el funcionamiento del "shunt" del ácido mevalónico en embrión de pollo, observándose que la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de MVA tomada como índice del mencionado "shunt" es prácticamente nula en cerebro e hígado pero considerable en riñón e intestino, con leves variaciones a lo largo del desarrollo embrionario en ambos órganos.

7.- La incorporación de MVA a lípidos insaponificables presenta niveles muy superiores en hígado que en el resto de los tejidos estudiados, si bien disminuye ligera-

mente a lo largo de la incubación. La incorporación en cerebro no cambia durante el mismo período, mientras que en intestino se alcanza un máximo hacia el día 19 y en riñón hacia el día 14. Cuando los resultados se expresan por órgano completo, se observa un ligero aumento de la incorporación a medida que aumenta la edad del embrión, de acuerdo con los cambios de peso de los correspondientes órganos.

8.- En cerebro, lanosterol y colesterol son los insaponificables a los que se incorpora el mayor porcentaje del MVA apareciendo asimismo un porcentaje apreciable en desmosterol durante todo el período embrionario ensayado. En hígado, el porcentaje de MVA incorporado a colesterol es máximo sólo durante los primeros días estudiados, disminuyendo claramente a la vez que aumenta la ubiquinona a medida que se acerca la eclosión. Las variaciones de los porcentajes de MVA incorporado a los distintos lípidos insaponificables no presentan variaciones tan acusadas en intestino y riñón. Sólo es destacable el máximo en la incorporación a colesterol observado en riñón hacia el día 14, que coincide con el máximo de incorporación a insaponificables totales en este órgano.

9.- La actividad específica de la HMG-CoA reductasa no presenta variaciones significativas a lo largo del desarrollo embrionario. Sus niveles son muy superiores en cerebro que en los restantes órganos estudiados. Sin embargo es de destacar el aumento de la actividad reductasa de hígado e intestino en los días inmediatos a la eclosión, mientras que en cerebro y riñón los niveles se mantienen más o menos semejantes a los observados en el embrión.

10.- La relacion molar colesterol/fósforo lipídico en microsomas, considerada como un índice del grado de fluidez de la membrana, no cambia en cerebro ni en hígado a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal, lo que parece corroborar que los cambios de la actividad reductasa relacionados con la edad no se llevan a cabo mediante modificaciones de la fluidez de la membrana microsomal. En ambos órganos el porcentaje de colesterol microsomal en forma libre es superior al esterificado y se mantiene sin cambios apreciables a lo largo del período estudiado.

11.- La incorporación de acetato a lípidos insaponificables presenta niveles mucho más elevados en cerebro que en hígado, aunque en ambos órganos disminuye a lo largo de todo el período estudiado. Cuando los resultados se refieren al órgano completo se observa, en ambos órganos, un ligero aumento en la incorporación de acetato los primeros días de estudio para descender más tarde hasta el momento de la eclosión.

12.- Tanto en cerebro como en hígado la incorporación de acetato a cada uno de los lípidos insaponificables detectados disminuye de forma semejante a la observada para los lípidos totales. En cerebro, el porcentaje de incorporación de acetato a colesterol aumenta de forma considerable durante casi todo el período estudiado, mientras que la incorporación a desmosterol disminuye de forma similar durante el mismo período. El porcentaje de incorporación al resto de los lípidos insaponificables no varía de forma acusada. En hígado, el acetato se incorpora fundamentalmente a colesterol, suponiendo éste mas del 50% de la incorporación obser

vada. El porcentaje de incorporación del resto de los lípidos insaponificables no varía prácticamente a lo largo del desarrollo embrionario.

VII. BIBLIOGRAFIA

10.- La relación molar colesterol/lípido saponificables de incorporación de acetato a los lípidos en microsomas, considerada como un índice de la fluidez de la membrana, no cambia en cerebro a lo largo del desarrollo embrionario y postnata. Parece corrección que los cambios de la actividad relacionada con la edad no se llevan a cabo mediante modificaciones de la fluidez de la membrana microsomal. Se ganen el porcentaje de colesterol microsomal en cerebro es superior al esterificado y se mantiene sin cambios apreciables a lo largo del período estudiado.

11.- La incorporación de acetato a los lípidos saponificables presenta niveles mucho más elevados en cerebro que en hígado, aunque en ambos órganos disminuye a lo largo de todo el período estudiado. Cuando los resultados se refieren al órgano completo se observa, en ambos órganos, un ligero aumento en la incorporación de acetato por períodos de estudio para disminuir más tarde hasta el momento de eclosión.

12.- Tanto en cerebro como en hígado la incorporación de acetato a cada uno de los lípidos insaponificables es detectados disminuye de forma semejante a la correspondiente a los lípidos totales. En cerebro, el porcentaje de incorporación de acetato a colesterol aumenta de forma considerable durante casi todo el período estudiado, mientras que la incorporación a desmostérol disminuye de forma similar durante el mismo período. El porcentaje de incorporación al resto de los lípidos insaponificables no varía de forma apreciable. En hígado, el acetato se incorpora fundamentalmente a colesterol, superando éste más del 50% de la incorporación total.

to biotransformation of cholesterol to bile acid
rat. Digestion 20, 121-136

GIRAUD, J. HOLLANDER, P.; MACOT, T. and CHEVALLI
1976. "In vivo" study of free and esterified cho
turnover in various tissues of the rat. Biochim
855-862

JACKSON, R. L.; MORRISSE, J. D. and GOTTO, A. M
Lipoprotein structure and metabolism. Physiol.
259-316

EISENBERG, G. and LEVY R. I. 1975. Lipoproteins
protein metabolism. In Hypolipidemic agents (Ed
chevsky D.) pp. 181-213. Berlin-Heidelberg-New
Springer-Verlag.

GLONSET, J. A. 1968. The plasma lecithin choles
transferase reaction. J. Lipid Res. 9, 155-167

BELLILOT, J.; POUEDANS, B.; MELIN, P.; PLOU, M.
BOR, D. G. and FOLONOVSKI. J. 1974. Effect of
ration in hepatic and plasmatic cholesterol
ion induced hyperlipemia syndrome. J. Biol. Chem.

CHEVALLIER, P. 1966. Les lipides cholestérol. In
Sci. Physiol. 19, 249-255

VII.- BIBLIOGRAFIA

CHEVALLIER, P. et GIRAUD. Transfert de cholestérol cholestérol
degrasance. Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 1966

HOLLANDER, P. and CHEVALLIER. 1977. Etude de
cholestérol "in vitro" en présence de lipoprotéines
the exchange of free cholesterol between plasma
erythrocytes. J. Lipid Res. 18, 1977

VII. - BIBLIOGRAFIA

- 1.- MATHE, D. and CHEVALLIER, F. 1980. Factors determining to biotransformation of cholesterol to bile acids in the rat. *Digestion* 20, 121-136
- 2.- GIRAUD D'HOLLANDER, F.; MAGOT, T. and CHEVALLIER, F. 1976. "In vivo" study of free and esterified cholesterol turnover in various tissues of the rat. *Biochimie*. 58, 855-862
- 3.- JACKSON, R. L.; MORRISET, J. D. and GOTTO, A. M. 1976 Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Rev.* 56, 259-316
- 4.- EISENBERG, G. and LEVY R. I. 1975. Lipoproteins and lipoprotein metabolism. *En Hypolipidemic agents* (Ed. Kritchevsky D.) pp. 191-213. Berlin-Heidelberg-New York-Springer-Verlag.
- 5.- GLOMSET, J. A. 1968. The plasma lecithin cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* 9, 155-167
- 6.- BREILLOT, J.; POURCANS, B.; MELIN, B.; PIOT, M. C.; ALCINDOR, L. G. and POLONOVSKI, J. 1974. Acetate ¹⁴C incorporation in hepatic and plasmatic cholesterol during Triton induced hiperlipemia. *Steroids. Lipid Res.* 5, 96-100
- 7.- CHEVALLIER, F. 1956. L'espace cholesterol du rats. *Archs. Sci. Physiol.* 10, 249-275
- 8.- CHEVALLIER, F. et GIRAUD, F. 1966. Renouvellement par transfert du cholesterol chez las rats adultes et en croissance. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 787-801
- 9.- D'HOLLANDER, F. and CHEVALLIER, F. 1972. Movements of cholesterol "in vitro" in rat blood and quantitation of the exchange of free cholesterol between plasma and erythrocytes. *J. Lipid Res.* 13, 733-744

- 10.- GOODMAN, D. S. 1965. Cholesterol ester metabolism. *Physiol. Rev.* 45, 747-839
- 11.- GOODMAN, Z. D. and LEQUIRE, V. S. 1975. Transfert of esterified cholesterol from serum lipoprotein to the liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 389, 325-336
- 12.- EGGEN, D. A. 1974. Cholesterol metabolism in rhesus monkey, squirrel monkey and baboon. *J. Lipid Res.* 15, 139-145
- 13.- CHVAPIL, M.; STITH, P. L.; TILLEMA, L. M.; CARLSON, E. C.; CAMPBELL, J. B. and ESKEKSON, C. D. 1976. Early changes in the arterial wall of chickens fed a cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 24, 393-405
- 14.- UCHIDA, E.; NOMURA, Y.; KADOWAKI, M.; TAKEUCHI, N. and YAMAMURA, Y. 1977. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Japan J. Pharmacol.* 27, 193-204
- 15.- WEISS, F. G. and SCOTT, M. 1979. Effects of dietary fiber, fat and total energy upon plasma cholesterol and other parameters in chickens. *J. Nutr.* 109, 693-701
- 16.- CHEEKE, P. R. 1973. Alfalfa: A natural hypogluccemic agent *Am. J. Clin. Nutr.* 26, 133
- 17.- DUPONT, J.; MATHIAS, M. M.; SPINDLER, A. A. and JANSON, P.H. 1980. Dietary fat saturation and cholesterol turnover in aging rats. *Age.* 3, 19-23
- 18.- UCHIDA, K.; NOMURA, Y.; KADOWAKI, M.; TAKASE, H.; TAKANO, K. and TAKEUCHI, N. 1978. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J. Lipid Res.* 19, 544-552

- 19.- ADLERSBERG, D.; SCHAEFER, L. E.; STEINBERG, A. G. and WANG, C.I. 1956. Age, sex, serum lipids and coronary atherosclerosis. J. Amer. Med. Assoc. 162, 619-622
- 20.- HALLBERG, L.; HOGDAHL, A. M.; SVANBORG, A. and VIKROT, O. 1966. Plasma lipids in women. Variation in cholesterol, phospholipids and triglyceridos at differents ages in a random population sample. Acta Med. Scand. 180, 697-707
- 21.- YAMAMOTO, M. and YAMAMURA, Y. 1971. Changes of cholesterol metabolism in the ageing rat. Atherosclerosis. 13, 365-374
- 22.- TAKEUCHI, N.; YAMAMURA, Y.; KATAYAMA, Y.; HAYASHI, C. and UCHIDA, K. 1976. Impairment of feed-back control and induction of cholesterol synthesis in rats by aging. Exp. Gerontol. 11, 121-126.
- 23.- HRUZA, Z. 1971. Increase of cholesterol turnover of old rats conected by parabiosis with young rats. Exp. Gerontol 6, 103-107
- 24.- KRITCHEVSKY, D. 1980. Age-related changes in lipid metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 165, 193-199.
- 25.- CROUSE, J. R.; GRUNDY, S. M. and AHRENS, E. H. 1972. Cholesterol distribution in the bulk tissues of man: Variation with age. J. Clin. Invest. 51, 1292-1296
- 26.- KRITCHEVSKY, S. 1978. How aging affects of cholesterol metabolism . Posgraduate Medicine. 63, 133-137
- 27.- BAIR, C. W. and MARION, W. W. 1978. Yolk cholesterol in eggs from various avian species. Poultry Sci. 57, 1260-1265.
- 28.- BECKER, W. A.; SPENCER, J. V.; VERSTRATE, J. A. and MIROSH, L. W. 1977. Genetic analysis of chicken egg yolk cholesterol. Poultry Sci. 56, 895-901

- 29.- WILLIAMS, J. 1967. Yolk utilization. In: The biochemistry of animal development. Vol II, pp. 341-382. Ed. Webber, R. New York, Academic Press.
- 30.- NOBLE, R. C. and MOORE, J. H. 1964. Studies on the lipid metabolism on the chick embryo. Can. J. Biochem. 42, 1729-1741.
- 31.- NOBLE, R. C. and MOORE, J. H. 1967. The partition of lipids between the yolk and yolk-sac membrane during the development of the chick embryo. Can. J. Biochem. 45, 949-958
- 32.- TSUJI, F. I.; BRIN, M. and WILLIAMS, H. H. 1955. Lipide phosphorus and cholesterol changes in the hen's during incubation. Arch. Biochem. Biophys. 56, 290-296
- 33.- MOORE, J. H. and DORAN, J. M. 1962. Lipid metabolism in the normal and vitamin B₁₂ -deficient chick embryo. Biochem. J. 84, 506-513
- 34.- FREEMAN, B.M. and VINCE, M. A. 1974. Development of the avian embryo. pp. 172-178. Ed. Chapman.
- 35.- SCHJEIDE, O. A. 1963. Lipoproteins of the fowl-serum, egg and intracellular. In : Progress in the chemistry of fats and other lipids, vol 6, pp. 251-289. Edit. Holman R. T. Lundberg W. O. and Malkin T. Oxford, Pergamon Press
- 36.- CHEVALLIER F. 1964. Transferts et synthese du cholesterol chez la rat an cours de sa croissance. Biochim. Biophys. Acta. 84, 316-339
- 37.- CALANDRA, S.;QUARTAROLI, G. C. and MONTAGUTI, M. 1975. Effect of cholesterol feeding on cholesterol biosynthesis in maternal and foetal rat liver. Europ. J. Clin. Invest. 5, 27-31

- 38.- LUTTON, C. et CHEVALLIER, F. 1972. Analyse des stérols des contenus digestifs et des féces du rat. Biochim. Biophys. Acta. 260, 133-145
- 39.- McINTYRE, N. and ISSELBACHER, K. J. 1973. Role of the small intestine in cholesterol metabolism. J. Clin. Nutr. 26, 647-656
- 40.- KANDUTSCH, A. A.; HEINIGER, H. and CHEN, H. W. 1977. Effects of 25-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, inhibitors of sterol synthesis, administered orally to mice. Bioch. Biophys. Acta. 486, 260-272
- 41.- THOMPSON, J. R.; BEITZ, D. C. and JACOBSON, N. L. 1977. Effect of dietary cholesterol and tallow on cholesterol synthesis in the castrated goat. J. Nutr. 107, 1632-1639
- 42.- SUGANO, M.; IDE, T.; ORAMATSU, H.; FUJISAKI, Y. and TAKAHARA, H. 1980. Dietary modification of the distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase and sterol synthesizing activities in the rat small intestine. J. Nutr. 110, 360-370
- 43.- SKLAN, D. and BUDOWSKI, P. 1979. Cholesterol metabolism in the liver and intestine of the chick: effect of dietary cholesterol, taurocolic acid and cholestyramine. Lipids 14, 386-390
- 44.- TREADWELL, C. R. and VAHOUNY, G. V. 1968. Cholesterol absorption. Handbook of Physiology vol. 3. pp. 1407-1438. (Am. Physiol. Soc. Washington)
- 45.- 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

- 46.- CHEVALLIER, F. et LUTTON, C. 1972. Mouvements des sterols dans le tube digestif d'un rat. Absorption du cholesterol de synthese. Biochim. Biophys. Acta. 274, 382-411
- 47.- 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
- 48.- SKLAN, D.; BUDOWSKI, P.; ASCARELLI, Z. and HURWITZ, S. 1973. Lipid absorption and secretion in the chick: Effect of raw soybean meal. J. Nutr. 103, 1299-1305
- 49.- KAPLAN, J. A.; COX, G. E. and TAYLOR, C. B. 1963. Cholesterol metabolism in man: Studies on absorption. Arch. Pathol. 76, 359-368
- 50.- DIETSCHY, J. M. and WILSON, J. D. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. N. Eng. J. Med. 282, 1128-1138; 1179-1183; 1241-1249
- 51.- VAHOUNY, G. V.; ROY, D. T.; GALLO, L. L.; STORY, J. A.; KRITCHEVSKY, D. and CASSIDY, M. 1980. Dietary fibers. III. Effects on chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. Am. J. Clin. Nutr. 33, 2182-2191
- 52.- WILSON, J. D. 1962. Influence of dietary cholesterol on excretion of cholesterol-¹⁴C by the rat. Am. J. Physiol. 202, 1073-1076
- 53.- LUTTON, C.; MATHE, D. et CHEVALLIER, F. 1973. Vitesses des processus de renouvellement du cholesterol contenu dans son espace de transfert chez la rat. II Influence de la ligature du cholédoque et de l'ingestion d'acides biliaries ou de cholestyramine. Biochim. Biophys. Acta. 506, 483-496

- 54.- EINARSSON, K. and GRUNDY, S. M. 1980. Effects of feeding cholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol absorption and hepatic secretion of biliary lipids in man. *J. Lipid Res.* 21, 23-34
- 55.- 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
- 56.- ANNISON, G.F, 1971. In: *Biochemistry and Physiology of the domestic fowl*. vol1, pp. 321-337, Eds Bell D. J. and Freeman, B.M. Academic Press. London and New York
- 57.- PEARCE, J. 1980. Comparative aspects of lipid metabolism in avian species. *Bioch. Soc. Trans.* 8, 295-296
- 58.- McINTYRE, N. 1971. Sterol absorption from lumen to liver. *Gut.* 12, 411-416
- 59.- CHEVALLIER, F. et BRANCO, R. J. 1963. Synthèse de cholestérol hépatique á partir d'acétate ¹⁴C chez les rats normaux et porteurs de fistule biliaire. Origine du cholestérol biliaire. *Revue Etud. Clin. Biol.* 8, 903-909
- 60.- OGURA, M., SHIGA, J. and YAMASAKI, J. 1971. Studies on the cholesterol pool as the precursor of bile acids in the rat. *Biochem. J.* 70, 967-972
- 61.- PENG, S.; HO, K. and TAYLOR, C. B. 1974. The role of the intestinal mucosa in cholesterol metabolism. Its relation to plasma and luminal cholesterol. *Expl. Molec. Pathol.* 21, 138-153

- 62.- CHEVALLIER, F. 1960. Origine des stérols fécaux. III. Influence de la concentration du cholestérol alimentaire sur les quantités du cholestérol excrété par la bile et par la paroi intestinale. Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 643-654
- 63.- VAN BELLE, H. 1965. Cholesterol, bile acids and atherosclerosis (North - Holland, Amsterdam)
- 64.- CHEVALLIER, F. et VYAS, M. 1963. Les origines du cholestérol du chyle. Mise en évidence á l'aide de la méthode des indicateurs nucléaires. Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 253-275
- 65.- 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
- 66.- SYLVEN, C. and NORDSTROM, C. 1970. The site of absorption of cholesterol and sitosterol in the rat small intestine. Scand. J. Gastroenterol. 5, 58-63
- 67.- ROSENFELD, R. S.; FUKUSHIMA, D. K.; HELLMAN, L. and GALLAGHER, T. F. 1954. The transformation of cholesterol to coprostanol. J. Biol. Chem. 211, 301-311
- 68.- POPJAK, G. and BEEKMANS, M. L. 1950. Extrahepatic lipid synthesis. Biochem. J. 47, 233-238
- 69.- SRERE, P. A.; CHAIKOFF, I. L.; TREITMAN, S.S. and BURNSTEIN, L. S. 1950, The extrahepatic synthesis of cholesterol. J. Biol. Chem. 182, 629-634
- 70.- DIETSCHY, J. M. and SIPERSTEIN, M. D. 1967. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. J. Lipid. Res. 8, 97-104.

- 71.- DIETSCHY, J. M. and WILSON, J. D. 1968. Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relative rates of synthesis in various tissues and mechanisms of control. *J. Clin. Invest.* 47, 166-174
- 72.- 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
- 73.- MAK, K. M. and TRIER, J. S. 1972. Radioautographic and chemical evidence for (5^3H)-mevalonate incorporation into cholesterol by rat villous absorptive cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 280, 316-328
- 74.- TAYLOR, C. B.; COX, G. E. and NELSON, L. G. 1955. "In vitro" studies on human hepatic cholesterol synthesis. *Circulation.* 12, 489
- 75.- KRUMDIECK, C. L. and HO, K. 1977. Intestinal regulation of hepatic cholesterol synthesis: an hypothesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 255-261
- 76.- ANGEL, A. and BRAY, G. A. 1979. Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 19, 355-362
- 77.- CHEVALLIER, F. and LUTTON, C. 1973. The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol.* 242, 61-62
- 78.- CHEVALLIER, F. and MAGOT, T. 1975. Evidence of major role of the intestine in cholesterol synthesis in the adult male rat. *Experientia.* 31, 627-629
- 79.- HUANG, W. Y. and KUMMEROW, F. A. 1976. Cholesterol and fatty acid synthesis in swine. *Lipids.* 11, 34-41

- 80.- LIEPA, G. U.; BEITZ, D. C. and LINDER, J. R. 1978. Cholesterol synthesis in ruminating and nonruminating goats J. Nutr. 108, 535-543.
- 81.- LUTTON, C. 1976. The role of the digestive tract in cholesterol metabolism. Digestion. 14, 342-356
- 82.- DIETSCHY, J.M. 1968. The role of bile salts in controlling the rate of intestinal cholesterologenesis. J. Clin. Invest. 42, 286-300
- 83.- TURLEY, S. D. and WEST, C. E. 1976. Effect of cholesterol and cholestyramine feeding and of fasting on sterol synthesis in the liver, ileum and lung of the guinea pig. Lipids. 11, 571-577
- 84.- SWANN, A.; WILEY, M. H.; SIPERSTEIN, M. D. 1975. Tissue distribution of cholesterol feedback control in the guinea pig. J. Lipid. Res. 16, 360-366
- 85.- WILSON, J. D. 1972. The relation between cholesterol absorption and cholesterol synthesis in the baboon. J. Clin. Invest. 51, 1450-1458
- 86.- BOCHENEK, W. J. and RODGERS, J. B. 1979. Dietary regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat intestine. Biochim. Biophys. Acta. 575, 57-62
- 87.- MIGUEL, S. G. 1977. Fatty acid and sterol synthesis by rat small intestine "in vitro" Lipids. 12, 1080-1083
- 88.- DAVISON, A. N. 1965. Brain sterol metabolism . Adv. Lipid. Res. 3, 171-196
- 89.- PATTERSON, J. D. and FINEAN, J. B. 1961. Ultracentrifugal fractionation of nerve tissue. J. Neurochem. 7, 251-258
- 90.- RAWLINS, F. A. y LOPEZ-JIMENEZ, C. 1979. Estudio comparativo de la mielina aislada de cerebros de ratas juvenes

- y adultas tratadas con un inhibidor de la biosíntesis de colesterol. Acta Cient. Venezolana. 30, 551-558.
- 91.- PAOLETTI, R.; GROSSI-PAOLETTI, E. and FUMAGALLI, R. 1969 In: Handbook of Neurochemistry pp. 195-222. Ed by Lajtha A. Plenum Press. New York
- 92.- MANDEL, P. and BIETH, R. 1951. La répartition des diverses fractions lipidiques au cours du développement du cerveau chez la rat. Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 973-981
- 93.- FISH, W. A.; BOYD, J. E. and STOKES, W. M. 1962. Metabolism of cholesterol in the chick embryo. III Localization and turnover of desmosterol (24-dehydrocholesterol) J. Biol. Chem. 237, 334-337
- 94.- KRITCHEVSKY, D. and HOLMES, W. L. 1962. Occurrence of desmosterol in developing rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 128-131
- 95.- FUMAGALLI, R. and PAOLETTI, R. 1963. The identification and significance of desmosterol in developing human and animal brain. Life. Sci. 2, 291-295
- 96.- PAOLETTI, R.; FUMAGALLI, R.; GROSSI-PAOLETTI, E. and PAOLETTI, P. 1965. Studies on brain sterols in normal and pathological conditions. J. Am. Oil. Chem. Soc. 42, 400-404
- 97.- HINSE, C. H. and SHAH, S.N. 1971. Desmosterol reductase activity of rat brain during development. J. Neurochem. 18, 1989-1998
- 98.- WEISS, J. F.; GALLI, G. and GROSSI-PAOLETTI, E. 1968. Sterols with 29, 28 and 27 carbon atoms metabolically related to cholesterol occurring in developing and mature brain. J. Neurochem. 15, 563-575

- 99.- ADAMS, C. W. M. and DAVISON, A. N. 1960. The form in which cholesterol occurs in the adult C.N.S. J. Neurochem. 5, 293-296
- 100.- AGUILERA, J. A. 1979. Evolución del contenido en colesterol y de la incorporación de ácido mevalónico en hígado, cerebro y riñón de pollo a lo largo del desarrollo postnatal. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Granada.
- 101.- ADAMS. C. W. M. and DAVISON 1959. The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. J. Neurochem. 4, 282-289
- 102.- JOHNSON, A. C.; Mc NABB, A. R. and ROSSITER, R.J. 1948 Lipids of normal brain. Biochem. J. 43, 573-577
- 103.- RAMSEY, R.B.; JONES, J. P.; NAQVI, S. H. M. and NICHOLAS, H. J. 1971. The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue: II A comparison of "in vitro" and "in vivo" methods. Lipids. 6, 225-232
- 104.- RAMSEY, R. B. 1973. New concepts in brain cholesterol metabolism. Biochem. Soc. Trans. 1, 341-348
- 105.- CLARENBURG, R.; CHAIKOFF, I. L. and MORRIS, M. D. 1963 Incorporation of injected cholesterol into myelinating brain of the 17-day - old rabbit. J. Neurochem. 10, 135-143
- 106.- ETO. Y. and SUZUKI, K. 1972. Cholesterol esters in developing rat brain: enzymes of cholesterol ester metabolism. J. Neurochem. 19, 117-121
- 107.- CHOI, M. and SUZUKI, K. 1978. A cholesterol-esterifying enzyme in rat central nervous system myelin. J. Neurochem. 31, 879-885

- 108.- JOHNSON, R. C. and SHAH, S.N. 1978. Fatty acid and sterol specificity of cholesterol esterifying enzyme in developing rat brain. *Lipids*. 13, 777-782
- 109.- CLARENBURG, R.; STEINBERG, A. B.; ASLING, J. H. and CHAIKOFF, I. L. 1966. Development of hydrolytic cholesterol esterase activity in rat brain. *Biochemistry* 5, 2433-2440
- 110.- VOLPE, J. J.; HENNESSY, S. W. and WONG, T. 1978. Regulation of cholesterol ester synthesis in cultured glial and neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 528, 424-435
- 111.- SLAGEL, D. E., DITTMER, J. C. and WILSON, C. B. 1967. Lipid composition of human glial tumor and adjacent brain. *J. Neurochem.* 14, 784-798
- 112.- PAOLETTI, P.; SOLOWAY, A. H.; WHITMAN, B. and MESSER, J. R. 1966. Lipid biosynthesis from labeled precursors in an experimental brain tumor bearing mice. *Neurochim.* 9, 12-18
- 113.- JONES, J. P.; NICHOLAS, H. J. and RAMSEY, R. B. 1975. Rate of sterol formation by rat brain glia and neurons "in vitro" and "in vivo". *J. Neurochem.* 24, 123-126
- 114.- RAMSEY, R. B.; JONES, J. P. and NICHOLAS, H. J. 1971. The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue. Distribution in subcellular fractions as a function of time after intracerebral injection of (2 ¹⁴C)-mevalonic acid. *J. Neurochem.* 18, 1485-1493
- 115.- WAELSCH, H.; SPERRY, W. H. and STOYANOFF, V. A. 1940. Lipid metabolism in brain during myelination. *J. Biol. Chem.* 135, 297-302

- 116.- WAELSCH, H.; SPERRY, W. H. and STOYANOFF, V. A. 1950
The influence of growth and myelination on the disposition and metabolism of lipids in the brain. J. Biol. Chem. 140, 885-897
- 117.- HELLSTROM, K. H.; SIPERSTEIN, M. D.; BRICKER, L. A. and LUBY, L. J. 1973. Studies of the "in vivo" metabolism of mevalonic acid in the normal rat. J. Clin. Invest. 52, 1303-1313
- 118.- KANDUTSCH, A. A. and SAUCIER, S. E. 1969. Regulation of sterol synthesis in developing brains of normal and jimpy mice. Arch Bioch. Biophys. 135, 201-208
- 119.- EDMOND, J. 1974. Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. J. Biol. Chem. 249, 72-80
- 120.- WEBBER, R. J. and EDMOND, J. 1977. Utilization of L(+) 3-hydroxybutyrate, D (-)-3-hydroxybutyrate, acetoacetate and glucose for respiration and lipid synthesis in the 18-day-old rat. J. Biol. Chem. 252, 5222-5226
- 121.- CREMER, J. E.; TEAL, H. M. and HEATH, D. F. 1975. Regulatory factors in glucose and ketone body utilization by the developing brain. In: Normal and pathological development of energy metabolism. pp 133-141. Ed by Hommes F. A. and Van den Berg
- 122.- YEH, Y. Y. 1980. Partition of ketone bodies into cholesterol and fatty acids "in vivo" in different brain regions of developing rats. Lipids. 15, 904-907
- 123.- PATEL, M. S. and OWEN, O.E. 1977. Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. J. Neurochem. 28, 109-114

- 124.- YEH, Y. Y.; STREULI, V. L. and ZEE, P. 1977. Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rats. *Lipids* 12, 957-967
- 125.- WEBBER, R. J. and EDMOND, J. 1979. The "in vivo" utilization of acetoacetate, D-(-)-3-hydroxybutirate and glucose for lipid synthesis in brain in the 18-day-old rat. *J. Biol.Chem.* 254, 3912-3920
- 126.- BUCKLEY, B. M. and WILLIAMSON, D.H. 1973. Acetoacetate and brain lipogenesis: Developmental pattern of acetoacetyl-Coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain. *Biochem. J.* 132, 653-656.
- 127.- PLEASURE, D.; LICHTMAN, C., GASTMAN, S.; LIEB, M.; ABRAMSKY, O. and SILBERBER, G. 1979. Acetoacetate and D-(-)-Beta-hydroxybuturate as precursors for sterol synthesis by calf oligodendrocytes in suspension culture: extramitochondrial pathway for acetoacetate metabolism. *J. Neurochem.* 32, 1447-1450.
- 128.- WILLIAMSON, D.H. and BUCKLEY, B. M. 1973. The role of ketone bodies in brain development. In: *Inborn errors of metabolism* pp 81-93 . Ed by Hommes F. A. and Van den Berg C. J. Academic Press. London and New York.
- 129.- PATEL, M. S. and OWEN, O. E. 1976. Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. Evidence for conversion of acetoacetate into acetyl coenzyme A in the cytosol. *Biochem. J.* 156, 603-607
- 130.- PATEL, T. B. and CLARK, J. B. 1978. Acetoacetate metabolism in rat brain. Development of acetoacetyl coenzyme A deacylase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase. *Biochem. J.* 176, 951-958

- 131.- KLEE, C. B. and SOKOLOFF, L. 1967. Changes in D-(-)- β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. *J. Biol. Chem.* 242, 3880-3883.
- 132.- PAGE, M. A.; KREBS, H. A. and WILLIAMSON, D. H. 1971. Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. *Biochem. J.* 121, 49-53
- 133.- GREENGARD, O. and THORNDIKE, J. 1974. Changing enzyme patterns in chick organs during development. *Enzyme* 17, 333-378
- 134.- NEHLIG, A.; LEHR, P. R. and GAYET, J. 1978. Utilization of 3-hydroxybutyrate by chick cerebral hemispheres during postnatal maturation. *Comp. Biochem. Physiol.* 61, 59-64
- 135.- DOBBING, J. and KERSLEY, J. B. 1963. The influence of early nutrition on brain cholesterol accumulation during growth. *J. Physiol.* 166, 34p
- 136.- SMITH, M. E. 1963. The effect of fasting on lipid metabolism of the central nervous system of the rat. *J. Neurochem.* 10, 531-536
- 137.- IDE, T.; OKAMATSU, H. and SUGANO, M. 1978. Effects of dietary fats on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaril-CoA reductase and sterol synthesis in the liver of fasted refed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 24, 535-546
- 138.- TEEKELL, R. A.; BREIDENSTEIN, C. P. and WATTS, A. B. 1975. Cholesterol metabolism in the chicken. *Poultry Sci.* 54, 1036-1042.

- 139.- SIMKO, V.; NEMEC, R. and GINTER, E. 1970. Incorporation of acetate-1-C¹⁴ into liver cholesterol of rats subjected to prolonged exercise. *Experientia*. 26, 749-750
- 140.- TAKEUCHI, N.; KATAYAMA, Y.; MATSUMIYA, F.; UCHIDA, K. and YAMAMURA, Y. 1976. Feed-back control of cholesterol synthesis in partially hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Acta*. 450, 57-68.
- 141.- SHAO, M.J. S. and LEI, K. Y. 1980. Conversion of (2-¹⁴C) mevalonate into cholesterol, lanosterol and squalene in cooper deficient rats. *J. Nutr.* 110, 859-867
- 142.- GOULD, R. G. and SWRYD, E. A. 1966. Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *J. Lipid. Res.* 7, 698-707.
- 143.- GRANDGEORGE, M.; CHABANNES, B.; DUPERRAY, B. et PACHECO H. 1977. Effect des cholérétiques sur l'incorporation de l'acétate (¹⁴C-1) dans le cholestérol, les acides gras et les acides biliars par des coupes de foie ou d'intestin et par des homogénats de foie de rat. *J. Pharmacol.* 8, 315-331
- 144.- GRANDGEORGE, M. DUPERRAY, B. et PACHECO, H. 1977. Etude de la biosynthese des acides biliars par des coupes de foie de rat a l'aide de (1-¹⁴C) acétate: resultats obtenus chez des animaux témoins et des animaux recevant de la cholestyramine. *J. Pharmacol.* 8, 293-314
- 145.- TURLEY, S. D. and DIETSCHY, J. M. 1979. Regulation of biliary cholesterol output in the rat: dissociation from the rate of hepatic cholesterol synthesis, the size of the hepatic cholesteryl ester pool, and the hepatic uptake of chylomicron cholesterol. *J. Lipid. Res.* 20, 923-934.

- 146.- SIPERSTEIN, M. D.; CHAIKOFF, I.L. and REINHARDT, W. O. 1952. C¹⁴-Cholesterol. V Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol J. Biol. Chem. 198, 111-114
- 147.- WESTERGAARD, H. and DIETSCHY, J. M. 1976. Mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. J. Clin. Invest. 58, 97-108
- 148.- 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
- 149.- SHEFER, S.; HAUSER, S.; BEMERSKY, I. and MOSBACH, E. H. 1970. Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. J. Lipid Res. 11, 404-411
- 150.- CHOBANIAN, A. V.; HOLLANDER, N.; SULLIVAN, M. and COLUMBO M. 1962. Body cholesterol metabolism in man. I. the equilibration of serum and tissue cholesterol. J. Clin. Invest. 41, 1732-1737
- 151.- NERVI, F. O.; CARELLA, M. and DIETSCHY, J. M. 1976. Dissociation of β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA reductase activity from the overall rate of cholesterol synthesis in the liver following the intravenous administration of lipid. J. Biol. Chem. 251, 3831-3833
- 152.- JESKE, D. J. and DIETSCHY, J. M. 1980. Regulation of rates of cholesterol synthesis "in vivo" in the liver and carcass of the rat measured using (³H) water. J. Lipid Res. 21, 364-376
- 153.- LEVEILLE, G.A.; ROMSOS, D. R.; YEH, Y. Y. and O'HEA E. K. 1975. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. Poultry. Sci. 54, 1075-1093

- 154.- 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.
- 155.- SHAH, S. N. 1973. Regulation of hepatic cholesterol synthesis from mevalonate in suckling and weaned rats. *Lipids* 8, 289-288
- 156.- JOHNSON, R. C. and SHAH, S. N. 1974. Hepatic cholesterol synthesis from mevalonate and squalene in rats: effects of feeding cholesterol supplemented diet during weaning and following starvation. *Lipids* 9, 962-970
- 157.- ANDERSEN, J. M. and DIETSCHY, J. M. 1977. Regulation of sterol synthesis in 16 tissues of rat. I Effect of diurnal light cycling, fasting, stress, manipulation of enterohepatic circulation and administration of chylomicrons and triton. *J. Biol. Chem.* 252, 3646-3651
- 158.- SHAPIRO, D. J. and RODWELL, V. W. 1969. Diurnal variation and cholesterol regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 867-872
- 159.- REYNIER, M. O.; MARTEAU, CH.; VIGNE, J. L.; MULE, A.; CROTTE, C. and GEROLAMI, A. 1977. Action of three bile acids on hepatic and intestinal cholesterologenesis in the rat. *Lipids* 12, 254-257
- 160.- SHEFER, S.; HAUSER, R.; LAPAR, V. and MOSBACH, E. H. 1973. Regulatory effects of sterols and bile acids on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and cholesterol 7- α -hydroxylase in the rat. *J. Lipid. Res.* 14, 573-580

- 161.- NERVI, F. O. and DIETSCHY, J. M. 1975. Ability of six different lipoprotein fractions to regulate the rate of hepatic cholesterologenesis "in vivo" J. Biol. Chem. 250, 8704-8711
- 162.- ANDERSEN, J. M. and DIETSCHY, J. M. 1977. Regulation of sterol synthesis in 15 tissues of rats. II Role of rat and human high and low density plasma lipoprotein and of rat chylomicron remnants. J. Biol. Chem. 252, 3652-3659
- 163.- ANDERSEN, J. M. and DIETSCHY, J. M. 1976. Regulation of sterol synthesis in adrenal gland of the rat by both high and low density human plasma lipoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 880-885
- 164.- ANDERSEN, J. M. and DIETSCHY, J. M. 1978. Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis of the rat. J. Biol. Chem. 253, 9024-9032
- 165.- GOULD, R. G. 1951. Lipid metabolism and atherosclerosis Am. J. Med. 11, 209-227
- 166.- NERVI, F. O. and DIETSCHY, J. A. 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, 895-905
- 167.- SHERRILL, B. C. and DIETSCHY, J. M. 1978. Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. J. Biol. Chem. 253, 1859-1867

- 168.- REDGRAVE, T. G. 1970. Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons J. Clin. Invest. 49, 465-471
- 169.- HIGGINS, J. M. and FIELDING, C. J. 1975. Lipoprotein lipase, mechanism of formation of triglyceride-rich remnant particles from very low density lipoproteins and chylomicrons. Biochemistry, 14, 2288- 2292
- 170.- NERVI, F. O. WEISS, H. J. and DIETSCHY, J. M. 1975. The kinetics characteristics of inhibition of hepatic cholesterogenesis by lipoproteins of intestinal origin J. Biol. Chem. 250, 4145-4151
- 171.- GONZALEZ, R.; DEMPSEY, M. E.; ELLIOT, A. Y. and FRALEY E. 1974. Studies on sterol synthesis, synthesis regulation and transport in cultured human kidney. Exp. Cell. Res. 87, 152.158.
- 172.- ROTHFELD, B.; PARE, W. P.; VARADY, A.; ISOM, K. E. and KARMEN, A. 1973. The effects of environmental stress on cholesterol synthesis and metabolism. Biochem. Med. 7, 292-298
- 173.- EDMOND, J.; FOGELMAN, A. M. and POPJAK, G. 1976. Mevalonate metabolism: role of kidneys. Science 193, 154-156.
- 174.- RASKIN, P. and SIPERSTEIN, M. D. 1974. Metabolism of mevalonic acid for kidney tissue "in vitro" J. Lipid. Res. 15, 20-25
- 175.- EDGREN, B. and HELLSTROM, K. 1972. "In vivo" studies of the metabolism of mevalonic acid in nephrotic rats. Nutr. Metabol. 14, 331-338
- 176.- GANS, J. H.; BLOCK, A. J. and CARTER, M. K. 1973. "In vivo" incorporation of ^{14}C into liver and kidney sterols

from parenterally administered (2-¹⁴C) D, L- mevalonic acid. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 144, 609-612

- 177.- WILEY, M. H.; HOUTON, M. M. and SIPERSTEIN, M. D. 1977
The quantitative role of the kidneys in "the vivo" metabolism of mevalonate. J. Biol. Chem. 252, 548-554
- 178.- GOODMAN, D. S. 1964. Squalene in human and rat blood plasma. J. Clin. Invest. 43, 1480-1485
- 179.- GOLD, P. H. and OLSON, R. E. 1966. Coenzyme Q. The biosynthesis of coenzyme Q₉ in rat tissue slices. J. Biol. Chem. 241, 3507-3516
- 180.- EDMOND, J. and POPJAK, G. 1974. Transfer of carbon atoms from mevalonate to n-fatty acids. J. Biol. Chem. 249, 66-71
- 181.- RIGUETTI, M.; WILEY, H.; MURRILL, P. A. and SIPERSTEIN M. D. 1976. The "in vitro" metabolism of mevalonate by sterol and non-sterol pathways. J. Biol. Chem. 251, 2716-2721
- 182.- FOGELMAN, A. M; EDMOND, J.; POPJACK, G. 1975. Metabolism of mevalonate in rats and man not leading to sterols. J. Biol. Chem. 250, 1771-1775
- 183.- LINDER, J. R. and BEITZ, D.C. 1978. Sterol synthesis and CO₂ production from mevalonate in calves. J. Lipid. Res. 19, 836-840
- 184.- FEARS. R.; UMPLEBY, M. A. 1979. Evidence for operation of the extrahepatic lipoprotein receptor system "in vivo" in rats. Effect of dietary cholesterol and orotic acid, alone or in combination, on the rate of synthesis of cholesterol and fatty acid in various tissues, measured by using ³H₂O. Biochem. J. 182, 803-809

- 185.- KRIS-ETHERTON, P. M. and FRANTZ, I. D. 1979. Inhibition of cholesterol synthesis in mammary tissue, lung and kidney following cholesterol feeding in the lactating rat. *Lipids* 14, 907-912
- 186.- GONZALEZ, R. and GOLDBERG, M. E. 1977. Origin of intracellular cholesterol in renal-cell carcinoma. *The Lancet* 23, 912
- 187.- GONZALEZ, R. and DEMPSEY, M. E. 1977. Sterol synthesis in cultured human renal cell cancer. *J. Urology*, 117, 708-711
- 188.- HAGENFELDT, L. and HELLSTROM, K. 1972. Blood concentration and turnover of circulating mevalonate in the rat. *Life. Sci.* 11, 669-676
- 189.- CLINKENBEARD, K. D.; REED, W. D.; MONEY, R. A. and LANE M. D. 1975. Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J. Biol. Chem.* 250, 3108-3116.
- 190.- CLINKENBEARD, K. D.; SUGIYAMA, T.; MOSS, J.; REED, W. D. LANE, M. D. 1973. Molecular and catalytic properties of cytosolic acetoacetyl Coenzyme A thiolase from avian liver. *J. Biol. Chem.* 248, 2275-2284
- 191.- SUGIYAMA, T.; CLINKENBEARD, K. D.; MOSS, J. and LANE, M. D. 1972. Multiple cytosolic forms of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl Co-A synthase: possible regulatory role in cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 255-261

- 192.- MILDDLETON, B. 1973. The oxoacyl-Coenzyme A thiolases of animal tissues. *Biochem. J.* 132, 717-730
- 193.- LAZARO, J. J. 1980. Acetoacetyl CoA tiolasa de hígado y cerebro de embrión de pollo. 19 Congreso Luso-Español de Bioquímica. Univ. Coimbra 23-26 Septiembre
- 194.- CLINKENBEARD, K. D.; SUGIYAMA, T.; REED, W.D. and LANE M. D. 1975. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthase from liver. Purification properties and role in cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 250, 3124-3135
- 195.- MIZIORKO, H. M. and LANE, M. D. 1977. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. Participation of acetyl-S-enzyme and enzyme-S-hydroxymethylglutaryl-S CoA intermediates in the reaction. *J. Biol. Chem.* 252, 1414-1420
- 196.- DASHTI, N. and ONTKO, J. A. 1979. Rate-limiting function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthase in ketogenesis. *Biochem. Med.* 22, 365-374
- 197.- CHANG, F. Y. and LIMANEK, J. S. 1980. Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 255, 7787-7795
- 198.- 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
- 199.- RODWELL, V. W.; NORDSTROM, J. L. and MITSCHELEN, J. J. 1976. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid. Res.* 14, 373-412

- 200.- BLOCH, K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. Science. 150, 19-28
- 201.- BEITIA, E.D. and PORTER, J. W. 1976. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. Ann. Rev. Biochem. 45, 113-142
- 202.- GOUGH, D. P. and HEMMING, F. W. 1970. The characterization and stereochemistry of biosynthesis of dolichols in rat liver. Biochem. J. 118, 163-166
- 203.- POPJAK, G.; GOODMAN, W.S.; CORNFORTH, J. W.; CORNFORTH, R. H. and RYHAGE, R. 1961. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XV Mechanism of squalene biosynthesis from farnesyl pyrophosphate and from mevalonate. J. Biol. Chem. 236, 1934-1947
- 204.- OLSON, R. E. 1968. Biosynthesis of ubiquinones in animals. In Vitamins and Hormones. Harris R. S., Wool I. G. and Loraine J. A. editors. Academic Press. New York. 24, 551-574
- 205.- FAUST, J. R.; GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. 1979. Synthesis of ubiquinone and cholesterol in human fibroblasts: regulation of a branched pathway. Arch. Biochem. Biophys. 192, 86-99
- 206.- JAMES, M. J. and KANDUTSCH, A. A. 1979. Inter-relationships between dolichol and sterol synthesis in mammalian cell cultures. J. Biol. Chem. 254, 8442-8446
- 207.- BROWN, M. S.; FAUST, J. R.; GOLDSTEIN, J. L.; KANEKO, I. and ENDO, A. 1978. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B) a competitive inhibitor of the reductase. J. Biol. Chem. 253, 1121-1128

- 208.- RODWELL, V. M.; Mc NAMARA, D.J. and SHAPIRO, D. S.
1973. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl
coenzyme A reductase. *Adv. Enzymol.* 38, 373-412
- 209.- SUGANO, M.; OKAMATSU, H. and IDE, T. 1978. Properties
of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in
villous and crypt cells of the rat small intestine. *Agric.
Biol. Chem.* 42, 2009-2014
- 210.- SUGANO, M. and FUJISAKI, Y. 1980. Effect of the type of
diet on the distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl
coenzyme A (HMG-CoA) reductase in rat small intestine.
Experientia 36, 1399-1400
- 211.- BROWN, M. S.; DANA, S. E. and GOLDSTEIN, J. G. 1973.
Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 2162-2166
- 212.- KRONE, W.; BETTERIDGE, D. J. and GALTON, D.J. 1979.
Regulation on sterol synthesis in human lymphocytes:
evidence for post-transcriptional control by low den-
sity lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 574, 361-
365.
- 213.- JOHNSTON, D.; CAVENEE, W.K.; RAMACHANDRAN, C. K. and
MELNYKOVYCH. 1979. Cholesterol biosynthesis in a variety
of cultured cells. Lack of correlation between synthesis
and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
reductase caused by dexamethasone. *Biochim. Biophys.
Acta.* 572, 188-192.
- 214.- SHEFER, S.; HAUSER, S.; LAPAR, V. and MOSBACH, E. H.
1972. HMG-CoA reductase of intestinal mucosa and liver
of the rat. *J.Lipid. Res.* 13, 402-412

- 215.- SUDJIC, M. M. and BOOTH, R. 1976. Activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in brains of adult and 7-day-old-rats. *Biochem. J.* 154, 559-560
- 216.- ARAGON, M. C.; GIMENEZ, C.; VALDIVIESO, F. and MAYOR, F. 1978. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity in rat brain during development. *J. Neurochem.* 30, 649-650
- 217.- GOLDFARB, S. 1972. Submicrosomal localization of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Febs Lett.* 24, 153-155.
- 218.- MITROPOULOS, K. A.; VENKATESAN, S.; BALASUBRAMANIAN, S. and PETERS, T.J. 1978. The submicrosomal localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, cholesterol 7- α -hydroxylase and cholesterol acyltransferase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 82, 419
- 219.- MALTESE, W. A. and VOLPE, J. J. 1979. Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in homogenates of developing rat brain. *Biochem.J.* 182, 367-370
- 220.- NESS, G. C.; MILLER, J. P.; MOFFLER, M.H.; WOODS, L. S. and HARRIS, H. B. 1979. Perinatal development of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat lung, liver and brain. *Lipids.* 14, 447-450
- 221.- McNAMARA, D. J. QUACKENBUSH, F. W. and RODWELL, V. W. 1972. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Developmental pattern. *J. Biol. Chem.* 247, 5805-5810
- 222.- SHAPIRO, D. J. and RODWELL, V. W. 1971. Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 246, 3210-3216.

- 223.- ALEJANDRE, M.J.; RAMIREZ, H.; SUAREZ, M. D. and GARCIA-PEREGRIN, E. 1981. Different developmental patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in chick tissues according to their role in cholesterologenesis. Biol. Neonate. En prensa
- 224.- BEG, Z. H., ALLMAN, D.W. and GIBSSON, D. M. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with AMPc and with protein fractions of rat liver cytosol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1362-1369
- 225.- BROWN, M. S.; BURNSCHEDE, G.Y. and GOLDSTEIN, J. 1975 Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. J. Biol. Chem. 250, 2502-2509
- 226.- NORDSTROM, J. L.; RODWELL, V. W. and MITSCHELEN, J. J. 1977. Interconversion of active and inactive forms of rat liver hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. J. Biol. Chem. 252, 8924-8934
- 227.- INGEBRITSEN, T. S.; LEE, A.; PARKER, R. A. and GIBSON D. M. 1978. Reversible modulation of the activities of both liver microsomal hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and its inactivating enzyme. Evidence for the regulation by phosphorylation-dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1268-1277
- 228.- VICKERS, J. D. and RATHBONE, M. P. 1979. The effects of membrane cholesterol depletion upon erythrocyte membrane-bound enzymes. Can. J. Biochem. 57, 1144-1152
- 229.- BEG, Z. H.; STONIK, J. A. and BREWER, H. B. 1977. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from chick liver. FEBS Lett. 80, 123-129

- 230.- KLEINSEK, D. A.; JABALQUINTO, A.M. and PORTER, J. W. 1980. "In vivo" and "in vitro" mechanisms regulating rat liver β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase activity. J. Biol. Chem. 255, 3918-3923
- 231.- GOLDSTEIN, J. L.; DANA, S. E. and BROWN, M.J. 1974. Sterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familiar hypercholesterolemia. Proc. Nat. Acad. Sci. US 71, 4288-4292
- 232.- KIMELBERG, H. K. and PAPAHDJOPOULOS. 1974. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na^+ + K^+)-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 249, 1071-1080
- 233.- NAITO, M. 1978. Effects of cholesterol and cholesterol ester on cell function.1 Incorporation of free cholesterol and cholesterol oleate into the cell membrane and its effect on membrane fluidity, membrane fragility and DNA synthesis. Cell Struct. Funct. 3, 219-226
- 234.- SABINE, J. R. and JAMES, M.J. 1976. The intracellular mechanism responsible for dietary feedback control of cholesterol synthesis. Life Sci. 18, 1185-1192
- 235.- SIPAT, A. B.; JAMES, M.J. and SABINE, J. R. 1977. Effect of cholesterol feeding on β -hydroxy- β -methylglutaryl (HMG) CoA reductase and other microsomal enzymes in the rat liver. Proc. Aust. Biochem. Soc. 10, 53-55
- 236.- SABINE, J. R. 1979. Membrane-mediated control of cholesterol synthesis in isolated liver cells. Proc. Aust. Biochem. Soc. 12, 51

- 237.- MITROPOULOS, K. A.; VENKATESAN, S. and BALASUBRAMANIAN S. 1978. Compartmentation and supply of cholesterol: two important factors in the coordinate regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase and cholesterol 7- α -hydroxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 6, 878-883
- 238.- IDE, T.; OKAMATSU, H. and SUGANO, M. 1978. Regulation by dietary fats on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in rat liver. *J. Nutr.* 208, 601-612
- 239.- BAQUIR, Y. A. and BOOTH, R. 1977. The effect of dietary cholesterol on rat liver microsomal 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase activity. *Biochem. Soc. Trans.* 5, 294
- 240.- SIPAT, A. and SABINE, J. R. 1981. Membrane-mediated control of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochem. J.* 194, 889-893.
- 241.- EDWARDS, P. A. 1975. Effect of plasma lipoproteins and lecithin - cholesterol dispersions on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 409, 39-50
- 242.- JAKOI, L. and QUARFORDT, S. H. 1974. The induction of hepatic cholesterol synthesis in the rat by lecithin mesophase infusions. *J. Biol. Chem.* 249, 5840-5844
- 243.- EDWARDS, P. A.; FOGELMAN, A. M. and POPJAK, G. 1976. A direct relationship between the amount of sterol lost from rat hepatocytes and the increase in activity of HMG-CoA reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 64-69

- 244.- FOGELMAN, A. M.; EDMOND, J.; SEAGER, J. and POPJAK, G.
1975. Abnormal induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl
coenzyme A reductase in leukocytes from subjects with
heterozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol.
Chem. 250, 2045-2055
- 245.- EDWARDS, P. A.; POPJAK, G.; FOGELMAN, A. M. and EDMOND,
J. 1977. Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme
A reductase by endogenously synthesized sterols "in vi-
tro" and "in vivo" J. Biol. Chem. 252, 1057-1063
- 246.- SHEFER, S.; HAUSER, S.; LAPAR, V. and MOSBACH, G. H.
1973. Regulatory effects of dietary sterols and bile
acids on rat intestinal HMG-CoA reductase. J. Lipid
Res. 14, 400-405
- 247.- GEBHARD, R. L. and COOPER, A. D. 1978. Regulation on
cholesterol synthesis in cultured canine intestinal mu-
cosa. J. Biol. Chem. 252, 2790-2796
- 248.- BROWN, M. S. and GOLDSTEIN, J. L. 1979. Receptor media-
ted endocytosis: insights from the lipoprotein receptor
system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3330-3337
- 249.- GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. 1977. The low-density
lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.
Ann. Rev. Biochem. 46, 897-930
- 250.- BROWN, M. S.; DANA, S. E. and GOLDSTEIN, J. L. 1974.
Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
reductase activity in cultured human fibroblasts, com-
parison of cells from a normal subject and from a pa-
tient with homozygous familial hypercholesterolemia, J.
Biol. Chem. 249, 789-796

- 251.- BROWN, M. S. and GOLDSTEIN, J. L. 1980. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. J. Lipid. Res. 21, 505-517
- 252.- FAUST, J. R.; GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. 1979. Squalene synthetase activity in human fibroblasts regulation via the low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 5018-5022
- 253.- KANDUTSCH, A. A. and CHEN, H. W. 1975. Regulation of sterol synthesis in cultured cells by oxygenated derivatives of cholesterol. J. Cell. Physiol. 85, 415-424
- 254.- SLAKEY, L. L.; CRAIG, M. C.; BEYTIA, E.; BRIEDIS, A.; FELDBRUEGGE, D. H.; DUGAN, R. E.; QURESHI, A. A.; SUBRARAYAN, C. and PORTER, J. W. 1972. The effects of fasting, refeeding, and time of day on the levels of enzymes affecting the conversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A to squalene. J. Biol. Chem. 247, 3014-3022
- 255.- LEVY, H. R. and POPJAK, G. 1960. Biosynthesis of cholesterol. X. Mevalonic kinase and phosphomevalonic kinase from liver. Biochem. J. 75, 417-428
- 256.- DORSEY, J. K. and PORTER, J. W. 1968. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. J. Biol. Chem. 243, 4667-4670
- 257.- RAMACHANDRAN, C.K. and SHAH, S. N. 1977. Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain. J. Neurochem. 28, 751-757

- 258.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; GARCIA-MARTINEZ, J. and GARCIA-PEREGRIN, E. 1981. Brain phosphorylation and de carboxylation of mevalonic acid in the neonatal chick Enzyme 38, 25-29
- 259.- LINARES, A.; GARCIA-MARTINEZ, J.; SUAREZ, M. D. and GARCIA-PEREGRIN, E. 1980. Postnatal development of mevalonate phosphorylation in the chick brain and kidney. Biology of neonate 38, 25-29
- 260.- GARCIA-MARTINEZ, J.; SEGOVIA, J. A.; SUAREZ, M. D.; GARCIA-PEREGRIN, E. 1976. Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 202-208
- 261.- RAMACHANDRAN, C.K. and SHAH, S. N. 1976. Decarboxylation of mevalonate pyrophosphate is one rate-limiting step in hepatic cholesterol synthesis in suckling and weaned rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 42-47
- 262.- HENNING, V.; MOSLEIN, L. M. and LYNEN, F. 1959. Biosyn^uthesis of terpenes. V. Formation of pyrophosphomevalonic by phosphomevalonic kinase. Arch. Biochem. Biophys. 83, 259-267
- 263.- SHAMA BHAT, C. and RAMASARMA, T. 1979. Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase and mevalonate phosphate kinase by phenyl and phenolic compounds. Biochem. J. 181, 143-151
- 264.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D. ; GARCIA-MARTINEZ, J.; MARCO, C.; GARCIA-PEREGRIN, E. 1980. Estudio de la pirofosfomevalonato descarboxilasa de distintos órganos de pollo recién nacido. 1º Congreso Luso-Español de Bioquímica. Univ. Coimbra 23-26 Septiembre

- 265.- RANGANATHAN, S. and RAMASARMA, T. 1973. Inhibition of the biosynthesis of sterols by phenyl and phenolic compounds in rat liver. *Biochem. J.* 134, 737-743
- 266.- DURR, I. F. 1968. Factors affecting the metabolism of mevalonate by adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 663-671
- 267.- 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.
- 268.- JABALQUINTO, A. M. and CARDEMIL, E. 1980. Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis: role of 5-pyrophospho mevalonate decarboxylase. *Lipids.* 15, 196-199
- 269.- SANTIAGO, G.; GANSER, A.; MACARULLA, J. M. and GUERRA, F. 1968. "In vitro" effect of ascorbate on the phospholipid composition of various subcellular fractions. *Rev. Esp. Fisiol.* 24, 37-41
- 270.- CARR, J. J. and DRECKKER, I. J. 1962. Laboratory manual of pediatric micro and ultramicrobiochemical techniques. O' Brien and Ibloft F. A. Harper Row Publishers New York
- 271.- MARTENSON, E. H. 1963. Investigation of factors affecting the Liebermann-Burchard cholesterol reaction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 164-180
- 272.- COROMINAS, A. and PERMANYER, J. J. 1972. *Lipidos y lipoproteinas.* vol. 1. Edit. Cientifico Medica. Barcelona.
- 273.- 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, 265-275



- 274.- 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, 21-27
- 275.- SHAPIRO, D. J.; NORDSTROM, J. L. ; MITSCHELEN, J. J. RODWELL, V. W. and SCHINKE, R. J. 1974. Microassay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblast. Biochem. Biophys. Acta. 370, 369-377
- 276.- BARTLETT, G. R. 1959. Phosphorous assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234, 466-469
- 277.- NEEDHAM, J. 1931. Chemical embryology, 3 volumes (University Press, Cambridge, England)
- 278.- KNOX, W.E.; AUERBACH, V.H. and LIN, E.C.C. 1956. Enzymatic and metabolic adaptations in animals. Physiol. Rev. 36, 164-254
- 279.- GREENGARD, O. 1971. Enzymic differentiation in mammalian tissues. Essays Biochem. 7, 159-205
- 280.- BUDOWSKI, P.,; BOTTINO, N.R. and REISER, R. 1961. Lipid transport in the laying hen and the incubating egg. Arch. Biochem. Biophys. 93, 483-490
- 281.- CAMERINO, P.W. and WRIGHT, L.D. 1962. The biosynthesis of cholesterol in the developing chick embryo. J. Lipid Res. 3, 416-420