

TD-EP

R. 15.593

07-3-16

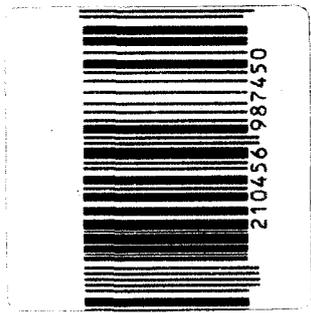
H-5
1
15

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

INFLUENCIA DE LA FENILALANINA Y DERIVADOS
SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS
REGULADORAS DE LA COLESTEROGENESIS.

MERCEDES CASTILLO TELLO
TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
INSTRUMENTOS 618.76.11.25
N.º COPIA 61581.58.94

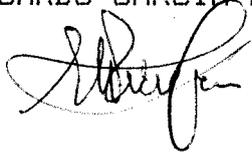


UN VERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
- 1 SET. 1986
REGISTRO DE ENTRADA
N.º 6721

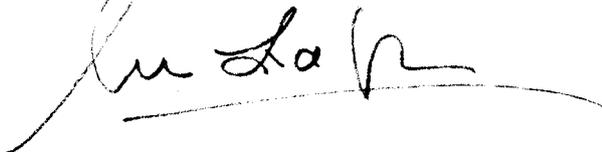
Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia
por la licenciada MERCEDES CASTILLO TELLO.

Directores de la Tesis:

Prof. Dr. D. EDUARDO GARCIA PEREGRIN



Prof. Dra. D^{ña} M^{ña} FLOR ZAFRA ORTEGA



Licenciada D^{ña} MERCEDES CASTILLO TELLO



Granada, Septiembre de 1986.

Al finalizar la presente Memoria, quiero expresar mi más profunda gratitud a los Profs. Dr. D. Eduardo Garcia-Peregrin y a la Dra. D. M. Flor Zafra Ortega, Directores de este trabajo por su constante orientación, dedicación y valiosas enseñanzas.

Al Prof. Dr. D. Fermin Sanchez de Medina que un día me permitió poder formar parte del Departamento de Bioquímica y a la Dra. D. Josefa L. Segovia Parra, por su constante estímulo y comprensión.

También quiero recordar a la Dra. D. Magdalena Ugarte, por la gran admiración que me produjo el conocer su labor profesional y que despertó en mí el interés por este tema de estudio.

Por último deseo agradecer al resto de mis compañeros, en especial a D. Soledad Riquelme y D. Felipe Rodriguez, su valiosa y desinteresada ayuda, así como al personal auxiliar del Departamento de Bioquímica.

A Antonio, Beatriz y Clara.

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA colesterol acil transferasa
Ala	Alanina
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
Asp	Acido aspártico
CoA	Coenzima A
DOPA	Dihidroxi-fenilalanina
d.p.m.	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-diamino-tetraacético
FPP	Farnesil pirofosfato
GABA	Acido 4-aminobutirico
Gln	Glutamina
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
G6P	Glucosa 6 Fosfato
G6PDH	" " " deshidrogenasa
HDL	Lipoproteinas de alta densidad
His	Histidina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril
IDL	Lipoproteinas de densidad intermedia
Ileu	Isoleucina
Ip-PP	Isopentenil pirofosfato
Km	Constante de Michaelis-Menten
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteinas de baja densidad
Leu	Leucina
Met	Metionina
MPE	-metil fenilalanina
MVA	Acido mevalónico
NAD	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
NADH	" " " reducido
NADP	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleotido oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleotido reducido
P-CPE	P-cloro fenilalanina
PMVA	Acido fosfomevalonico
POPOP	2',2'-p-fenilen-bis-(5-feniloxazol)
PPMVA	Acido pirofosfomevalónico
PPO	2,5-difeniloxazol
QM	Quilomicrones
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S.E.M.	Error extandar de la media
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tir	Tirosina
Val	Valina
VLDL	Lipoproteinas de muy baja densidad

INDICE

INTRODUCCION	11
1-PARTE TEORICA	14
1.A. METABOLISMO DE LA FENILALANINA	14
1.A.1. Sistema hidroxilante de la fenilalanina.	14
1.A.2. Propiedades de la fenilalanina hidroxilasa	16
1.A.3. Regulación de la actividad fenilalanina hidroxilasa.	18
1.A.4. Rutas alternativas del metabolismo de la fenilalanina.	20
1.B. HIPERFENILALANINEMIA y FENILCETONURIA CLASICA..	24
1.B.1. Síndrome de la hiperfenilalaninemia.	25
1.B.1.1. Fenilcetonuria clasica ó tipo I.	28
1.B.1.2. Hiperfenilalaninemias tipos II y III.	28
1.B.1.3. Hiperfenilalaninemias debidas a defectos en el coenzima Tipos IV y V.	29
1.B.1.4. Tirosinemia.	29
1.B.2. Patogenesis.	31
1.B.2.1. Alteraciones a nivel del metabolismo lipídico y proteico. Importancia del colesterol en la mielinización.	31
1.B.2.2. Alteraciones a nivel del metabolismo de aminoácidos y derivados.	40
1.B.3. Modelos experimentales de hiperfenilalaninemia.	44
1.C. METABOLISMO DEL COLESTEROL.	49
1.C.1. Dinámica del colesterol.	49

1.C.1.1. Absorción y transporte.	51
1.C.1.2. Síntesis.	58
1.C.1.3. Transformación y eliminación.	60
1.C.2. Biosíntesis del colesterol.	61
1.C.3. Papel del hígado en el metabolismo del colesterol.	65
1.C.4. Papel del cerebro en el metabolismo del colesterol.	67
1.C.5. Principales enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol.	71
1.C.5.1. HMG-CoA reductasa.	71
1.C.5.2. Mevalonato cinasa.	81
1.C.5.3. Fosfomevalonato cinasa.	84
1.C.5.4. Pirofosfomevalonato descarboxilasa.	85
2. PLAN DE TRABAJO	88
3. MATERIAL Y METODOS	89
3.A. MATERIAL	89
3.A.1. Material Biológico.	89
3.A.2. Acondicionamiento y alimentación de los animales.	89
3.A.3. Aparatos e Instrumentación.	90
3.A.4. Reactivos.	91
3.A.4.1. Tampones.	91
3.A.4.2. Productos reactivos.	92
3.A.4.3. Otros reactivos.	92
3.B. METODOS.	93
3.B.1. Determinación de la actividad HMG-CoA	

reductasa.	94
3.B.1.1. Fundamento de método radiactivo.	94
3.B.1.2. Técnica.	95
3.B.1.2.1. Aislamiento de los microsomas.	95
3.B.1.2.2. Reacción enzimática.	96
3.B.1.2.3. Aislamiento y medida de los productos de reacción.	98
3.B.1.2.4. Calculos y tratamiento estadístico.	99
3.B.2. Estudio de la fosforilación y descar- boxilación del ácido mevalónico.	100
3.B.2.1. Preparación de los extractos enzimáticos.	101
3.B.2.2. Fosforilación del ácido mevalónico.	101
3.B.2.2.1. Reacciones enzimáticas.	101
3.B.2.2.2. Detección y medida de los productos de reacción.	102
3.B.2.2.3. Calculos.	103
3.B.2.3. Descarboxilación del MVA.	106
3.B.2.3.1. Reacción enzimática.	106
3.B.2.3.2. Detección y medida de los productos	107
3.B.2.3.3. Calculos.	107
3.B.3. Tratamiento de tejidos para la determi- nación de aminoácidos y de la relación Fen/Tir.	108
3.B.3.1. Determinaciones analíticas.	109
3.B.3.2. Cálculo de las concentraciones de aminoácidos.	109
4. RESULTADOS	112

4.A. Determinación de la estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico en relación a la temperatura.	112
4.B. Influencia de la preincubación sobre las actividades enzimáticas.	122
4.C. Efecto "in vitro" de la fenilalanina y algunos de sus metabolitos sobre las actividades PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa.	130
4.C.1. Efecto de la fenilalanina.	130
4.C.2. Efecto del fenilpirúvico.	135
4.C.3. Efecto del fenilacético.	140
4.C.4. Efecto del fenilactico.	140
4.C.5. Efecto del o-hidroxi fenilacético.	149
4.C.6. Efecto del p-hidroxi fenilacético.	149
4.C.7. Efecto del p-hidroxi fenilactico.	158
4.C.8. Efecto de la feniletilamina.	158
4.C.9. Estudio comparativo de las inhibiciones de la actividad PPMVA descarboxilasa producidas por la fenilalanina y los metabolitos ensayados.	167
4.D. Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos sobre la actividad PPMVA descarboxilasa de hígado y cerebro.	169
4.E. Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos sobre la actividad HMG-CoA reductasa de hígado y cerebro.	172
4.F. Producción de un modelo experimental de hiperfenilalaninemia en pollo.	176
4.F.1. Efecto de las dietas empleadas sobre el peso de los animales y los órganos estudiados.	176

4.F.2. Variación de la relación fenil- alanina/tirosina con las distintas dietas y con distinto tiempo de tratamiento.	179
4.F.3. Efecto de las distintas dietas sobre la concentración de aminoácidos.	182
4.F.3.1. Efecto en plasma.	182
4.F.3.2. Efecto en cerebro.	182
4.F.3.3. Efecto en hígado.	182
4.G. Efecto de la hiperfenilalaninemia experimental sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.	195
4.H. Efecto de la hiperfenilalaninemia experimental sobre la actividad HMG-CoA reductasa.	198
5. DISCUSION.	202
6. CONCLUSIONES	217
7. BIBLIOGRAFIA	220

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La incapacidad de convertir la fenilalanina en tirosina, por un deficit o ausencia del sistema enzimático responsable de esta transformación, da lugar a una alteración patológica conocida como Fenilcetonuria.

Esta enfermedad se caracteriza por una elevación de los niveles de fenilalanina en plasma y en general en todos los tejidos. A causa del bloqueo enzimático y de la elevación de los niveles de fenilalanina, se produce una desviación del metabolismo normal hacia otras vias alternativas secundarias, con la aparición en plasma de concentraciones superiores a las normales de diversos metabolitos de la fenilalanina y que junto con la fenilalanina son los causantes de las diferentes anomalías patológicas que acompañan a la enfermedad, en la cual el retraso mental profundo, presente en la mayoría de los pacientes, es su manifestación clínica más grave.

La acumulación de la fenilalanina y sus metabolitos en los tejidos del organismo da lugar a que los sistemas enzimáticos intracelulares tengan que ajustar su función a la nueva situación establecida. De acuerdo con esto, se ha observado que numerosas reacciones enzimáticas importantes se inhiben en presencia de elevadas concentraciones de fenilalanina o de sus metabolitos.

Sin que exista un paralelismo entre esta elevación de los niveles de fenilalanina y sus metabolitos y el coeficiente de inteligencia de los pacientes fenilcetonuricos, está perfectamente comprobado que la prevención de la hiperfenilalaninemia se traduce en un satisfactorio desarrollo mental.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la causa de este retraso mental como puede ser un deficit en la mielinización y una disminución en la concentración de serotonina en sangre. En el mismo sentido, se ha sugerido que la causa que más satisfactoriamente podría justificar la hipomielinización asociada a la hiperfenilalaninemia sería la reducción de la síntesis del colesterol, ya que la modificación en la composición de las membranas cerebrales se considera una causa suficiente para el desarrollo de determinados desórdenes que pueden dar lugar a un proceso patológico.

Es en el comienzo de la vida cuando el colesterol parece desarrollar un papel principal en el proceso de mielinización. Todos los datos referentes a la estructura de la mielina coinciden en demostrar que la fracción lipídica de la mielina contiene colesterol, fosfolípidos y galactolípidos en una relación aproximada de 4:3:2. El colesterol es pues, el componente lipídico mayoritario, constituyendo aproximadamente el 20% de los lípidos del cerebro.

Se sabe que en el hombre, la mielinización se inicia hacia los cuatro meses de gestación y se completa a los dos años de vida aproximadamente, aunque actualmente se tienen evidencias de que es un proceso que de alguna forma continua durante toda la vida, aunque de forma casi imperceptible. De lo expuesto anteriormente se deduce la gran importancia de las lesiones cerebrales que se producen en los primeros meses de vida ya que la vulnerabilidad cerebral decrece a medida que aumenta el grado de mielinización.

A pesar de su importancia son relativamente escasos los conocimientos sobre los procesos bioquímicos que caracterizan una perfecta mielinización. Para que ésta se realice de manera óptima es necesaria la presencia de varias hormonas y un adecuado estado nutricional durante el desarrollo y crecimiento. Durante este tiempo la estructura y función del sistema nervioso sufren cambios profundos. En este sentido creemos de sumo interés acometer el estudio de las posibles variaciones en la biosíntesis del principal componente lipídico de la mielina normal, el colesterol, en circunstancias experimentales semejantes a las que se producen en la fenilcetonuria clásica.

En la biosíntesis del colesterol, se distinguen dos grandes etapas:

La primera, comprende la transformación de acetato en mevalonato, bien controlada a nivel de la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa.

La segunda consiste en el paso de mevalonato hasta colesterol, via isopentenil pirofosfato. Existen datos suficientes para pensar en un mecanismo de regulación secundario a nivel de la conversión del mevalónico en isopentenil pirofosfato.

Dada la gran similitud enzimática entre aves y mamíferos, con solo ligeras variaciones en la regulación hormonal, y a las especiales características que el proceso de mielinización presenta en el pollo, se ha elegido a este como animal de experimentación.

El empleo de animales de experimentación como modelo de alteraciones congénitas del metabolismo nos proporcionará una información básica sobre el funcionamiento del hígado y del cerebro y las interrelaciones existentes entre ambos órganos, así como algunos aspectos del mecanismo de inducción del daño cerebral asociado a estas enfermedades.

La evaluación del modelo experimental de esta aminoacidopatía se llevó a cabo mediante la determinación de la relación Fen/Tir en Plasma de animales a los que se les suministraba α -metil-fenilalanina, un inhibidor de la enzima que cataliza la transformación de fenilalanina en tirosina, junto con una concentración elevada de fenilalanina en la dieta sólida o bien en el agua de bebida.

Una vez establecidas las consecuencias bioquímicas primarias de la enfermedad pasamos a determinar como éstas concentraciones elevadas de fenilalanina y sus metabolitos podrían influir en las principales enzimas reguladoras del metabolismo del colesterol en hígado y cerebro a lo largo del desarrollo de esta enfermedad.

Con todo ello se pretende conseguir no solo un mejor conocimiento de los aspectos patológicos de la fenilcetonuria, sino profundizar en la elucidación de los complicados mecanismos moleculares responsables de la hipomielinización que acompaña a esta enfermedad.

PARTIE THEORICA

1. PARTE TEORICA

1.A. Metabolismo de la fenilalanina.

La l-fenilalanina, aminoácido esencial en el metabolismo humano, se utiliza durante el crecimiento en un 50% de su ingesta para la síntesis proteica; el resto es metabolizado o permanece como aminoácido libre en la sangre y otros tejidos.

La cantidad empleada en dicha síntesis se modifica fundamentalmente con la edad, siendo mínima cuando el organismo alcanza su completo desarrollo.

1.A.1. Sistema hidroxilante de la fenilalanina.

La principal vía de degradación de la fenilalanina es su hidroxilación en el carbono 4 para convertirse en tirosina. Esta vía metabólica sugerida por Neubauer ya en 1909 quedó demostrada mediante el uso de la fenilalanina deuterada en el año 1940 (1). La irreversibilidad de la reacción se comprobó en 1954 (2).

La reacción tiene lugar en el hígado por acción de una enzima específica: la fenilalanina hidroxilasa (l-fenilalanina tetrahydropteridina:oxígeno oxirreductasa (4-hidroxilante) EC-1.14.3.1.).

Udenfried y Cooper (3) demostraron la presencia de actividad fenilalanina hidroxilasa en hígado de varias especies de mamíferos, así como la ausencia en otros tejidos de los mismos. Así mismo demostraron también que la reacción requiere oxígeno molecular y NADH.

Kaufman definió el proceso de hidroxilación (4) y comprobó que era necesaria como cofactor de la reacción una pteridina oxidada derivada de la tetrahydropteridina (5); la 7,8-dihydrobiopterina (H_2 -Biopterina)(6). Este cofactor no es activo hasta que se reduce a su forma tetrahydrogenada (H_4 -Biopterina), siendo necesaria para esta reducción la participación de la dihydrofolato reductasa (6)(Fig. 1).

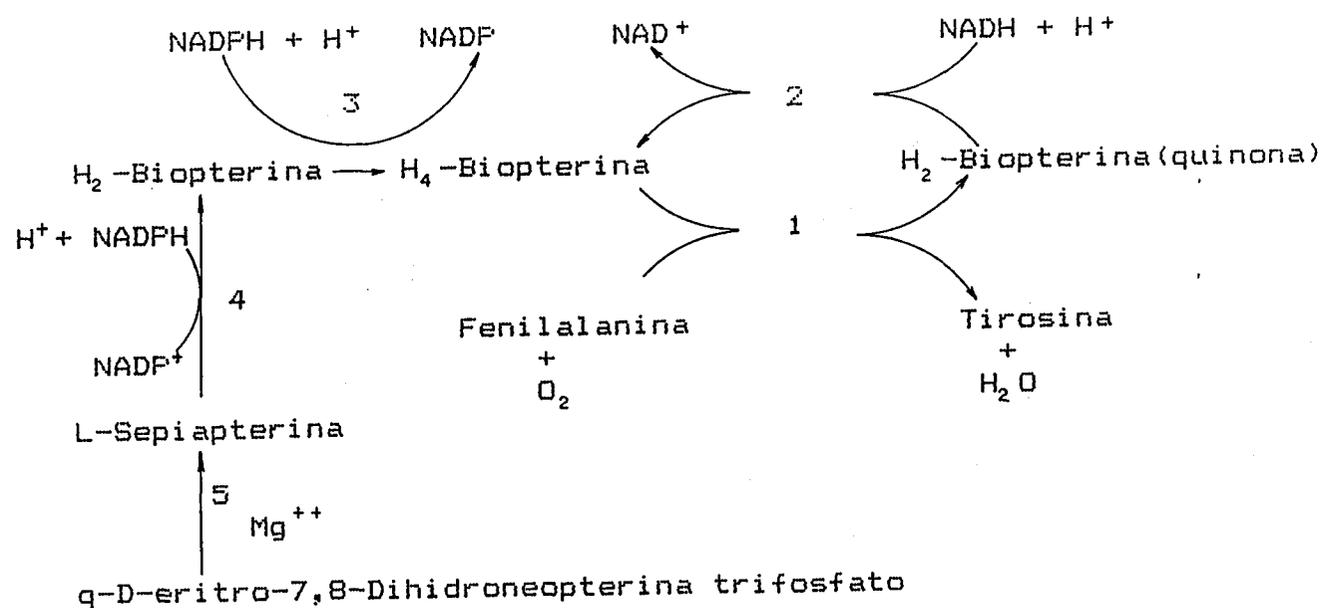


Fig. 1

- Enzimas: 1= Fenilalanina hidroxilasa
 2= Dihidropteridina reductasa
 3= Dihidrofolato reductasa
 4= Sepiapterina reductasa
 5= Dihidrobiopterina sintetasa

En los extractos crudos de hígado y presumiblemente en la célula hepática, el cofactor existe en una forma que es activa en el sistema hidroxilante sin la dihidrofolato reductasa (7). Esta dihidrofolato reductasa puede tener una función en la biosíntesis de la biopterina (7).

La biopterina es sintetizada a partir de guanosina trifosfato (GTP) en una secuencia de etapas enzimáticas (8,9) en las que es requerida la presencia de la dihidrobiopterina sintetasa.

La biopterina es el cofactor obligatorio en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (7,10,11). Este cofactor es un donador de electrones en el sistema, y si bien un número de pteridinas sintéticas reducidas pueden cumplir la misma función, la tetrahidrobiopteridina posee la Km adecuada y está pensada para ser el cofactor natural (7).

Los pacientes fenilcetonúricos tienen más altos niveles en plasma de biopterina que las personas normales. Una sobrecarga oral de fenilalanina administrada a sujetos normales conduce a un incremento de 4 ó 5 veces en compuestos relacionados con la biopterina. Sin embargo, los pacientes con deficiencia en biopterina (hiperfenilalaninemia tipo V) no responden con una elevación de biopterina en suero a una sobrecarga similar de fenilalanina (12).

LaDu y Zannoni (13,14) desarrollaron un método de ensayo directo de la reacción, y comprobaron que suministrando pteridina reducida en cantidades óptimas se evitaba la necesidad del sistema reductor de la misma.

Por otra parte, las constantes de Michaelis para el sustrato y el cofactor de la reacción parecen ser interdependientes de sus concentraciones, indicando así la existencia de un mecanismo multisustrato-multiproducto del tipo descrito por Cleland (15) y deduciéndose que se produciría una secuencia de conversión con mecanismo "ping-pong".

1.A.2. Propiedades de la fenilalanina hidroxilasa.

La fenilalanina hidroxilasa ha sido purificada a partir de hígado de rata (16,17), mono (18) y hombre (19,20,21). La fenilalanina hidroxilasa de hígado de rata

tiene un PM de 110,000(22). Fisher y col.(23) confirmaron estos resultados trabajando con enzima purificada de hígado de rata. Desde entonces numerosos investigadores y por distintos métodos han confirmado este dato y aportado que en hígado humano el PM es 100,000 (23,24,25,26). Por otro lado la enzima consiste en un dímero compuesto por dos subunidades diferentes de PM 50,000.

Kaufman y Fisher en 1970 pusieron de manifiesto las formas de monómero, dímero y tetramero (16). La forma tetramera de la hidroxilasa está fosforilada y se propuso que la conformación de forma tetramera de la enzima está determinada por el estado de fosforilación (27).

Se ha comprobado que la actividad hidroxilasa de la forma totalmente fosforilada de la enzima se incrementa tres veces cuando es medida con el cofactor natural, tetrahydrobiopterina (27). Como en el caso de otras enzimas poliméricas, se puede predecir que la formación del tetramero totalmente fosforilado tiene un efecto de cooperación en la actividad catalítica de la enzima.

La fenilalanina hidroxilasa es además una metaloproteína que contiene alrededor de una molécula de hierro por monómero (23) y que es esencial para la actividad hidroxilasa. Eliminando el hierro, resulta una pérdida de actividad enzimática, que puede ser restablecida por adición de cloruro ferroso. El hierro ferrico puede participar en la transferencia de electrones desde la tetrahydropterina hasta el oxígeno (23).

Parker y col.(28) han reseñado tres isoenzimas de fenilalanina hidroxilasa de hígado humano. Esto sugiere la posibilidad de una amplia variación en la herencia de los isoenzimas, que puede explicar la heterogeneidad clínica y bioquímica en la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa. Sin embargo, en estudios de variantes alélicas de la fosfoglucomutasa se ha observado que las isoenzimas son codificadas por el mismo alelo simple(29). Woof no pudo demostrar isoenzimas de fenilalanina hidroxilasa humana.

En hígado de rata, Barranger y col. en 1972 sugirieron la existencia de tres isoenzimas, para las que los valores de la constante de Michaelis y del pH óptimo son idénticos (30).

1.A.4. Regulación de la actividad fenilalanina hidroxilasa.

La fenilalanina es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas en las células de mamíferos(31). El transporte a nivel de membrana de los aminoácidos y la síntesis de proteínas requieren un mínimo y un máximo crítico de concentración de fenilalanina y tirosina en tejidos y cerebro (32). La fenilalanina hidroxilasa de hígado regula los niveles de fenilalanina y tirosina.

La disminución de las concentraciones por debajo de los valores límites y el consiguiente efecto devastador en el desarrollo de cerebro están bien documentados en la fenilcetonúria clásica (tipo I) en la cual, por mutación la fenilalanina hidroxilasa no es funcional. La situación inversa, la hipofenilalaninemia puede así mismo acarrear un daño cerebral como el que se observa en niños fenilcetonúricos sometidos a una dieta estricta carente de fenilalanina(33,34).

Las células del hígado poseen diversos mecanismos de mantenimiento de los niveles de fenilalanina en los tejidos mediante la modificación de la actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa. La regulación a corto plazo de la actividad enzimática es llevada a cabo por modulación via sustrato (fenilalanina y el cofactor biópterina) (22,35,36,37) y por fosforilación de la enzima (38,39,40).

La regulación de la actividad a largo plazo es efectuada por cambios en el nivel de la fenilalanina hidroxilasa, bien por síntesis "de novo" o por cambios en su degradación (41,42,43).

Esta síntesis "de novo" de la enzima es inducida por insulina, dexametasona y un factor proteico del suero (44,45), la suma de estos efectos puede alterar el nivel constitutivo de la enzima por lo menos 10 o 20 veces en cultivos celulares de hepatoma, aunque se desconoce si son también operativos en el hígado del organismo normal. En hígado de rata recién nacida, la fenilalanina hidroxilasa puede ser también inducida por hidrocortisona (46).

El concepto de inhibición por sustrato de la fenilalanina hidroxilasa por altos niveles de fenilalanina fue descrito por Udenfriend y Cooper desde el principio de los estudios cinéticos (3). Datos cinéticos "in vitro" más recientes muestran una inhibición de la hidroxilación

en presencia del cofactor natural, la biopterina, cuando la concentración de fenilalanina es mayor de 0,5 mM (16,35).

Kaufman así mismo demostró que la inhibición por exceso de sus sustratos (fenilalanina y oxígeno) no tiene lugar cuando la reacción se realiza en presencia de un análogo del cofactor, la 6,7 - dimetil tetrahydropteridina (26). Más tarde se demostró que la inhibición también tiene lugar en presencia del cofactor sintético (46) pero es más dramático en presencia de la biopterina (47).

Sin embargo la consideración del papel inhibitor de la fenilalanina sobre la fenilalanina hidroxilasa ha sido sustituido por un más nuevo concepto de la fenilalanina como activadora y reguladora de la actividad enzimática (22,36,37).

En efecto, la fenilalanina hidroxilasa es una enzima alostérica cuya actividad puede ser modificada por la fenilalanina la cual se liga a un punto distinto del sitio catalítico (22,36,37). Este punto distinto de activación de la enzima fué primero sugerido cuando un retraso inicial en la velocidad de la reacción fué comprobado que podía corregirse con fenilalanina y no con tetrahydropterina, siendo el tiempo de retraso inversamente proporcional a la concentración de fenilalanina (22).

Se estima que las concentraciones de biopterina y fenilalanina en el hígado son de 10^{-6} M y 2×10^{-4} M respectivamente (48). De este modo el papel de activación puede tener más importancia "in vivo" que en los estudios "in vitro". Ayling y Helfand (36) han mostrado también como la estructura del cofactor modifica la cinética de la reacción con respecto a la fenilalanina.

La lisolecitina y la quimotripsina incrementan la velocidad máxima y disminuyen dos veces la K_m de la fenilalanina hidroxilasa. Los detergentes suaves o el envejecimiento de la fenilalanina hidroxilasa desensibilizan el sitio de activación por la fenilalanina; por esto la enzima no puede ser activada por preincubación con fenilalanina (36).

1.A.4. Rutas alternativas del metabolismo de la fenilalanina.

La fenilalanina, además de su incorporación a las proteínas, se degrada siguiendo una vía principal pasando a tirosina. A parte de esto, se puede metabolizar a través de otras vías alternativas secundarias.

El paso secundario más importante es su transaminación para producir ácido fenilpirúvico, por acción de una transaminasa específica. Esta vía prácticamente no es utilizada en condiciones normales y es necesaria una concentración de fenilalanina plasmática superior a 0,5 mM para que pueda detectarse la presencia de ácido fenilpirúvico en la orina humana (49,50). El cofactor de la reacción es el piridoxal fosfato y el cosustrato el 2-cetoglutarato. Esta enzima es inducida por el sustrato pero no lo es por el cofactor ni por las hormonas esteroides en rata (51).

El ácido fenilpirúvico así formado es reducido a ácido fenilactico por una reductasa específica de los α -cetoácidos aromáticos (47), pero la mayor parte se descarboxila a ácido fenilacético, parte del cual se conjuga y transforma en fenilacetilglutamina.

El ácido fenilacético es el responsable del olor característico de la orina de los fenilcetonúricos, que llamó la atención de Folling (52) y cuya posterior investigación llevó al descubrimiento de la fenilcetonuria humana.

Otra posible fuente de ácido fenilacético podría ser a partir de la feniletilamina por acción de una aminooxidasa. La feniletilamina se forma por descarboxilación de la fenilalanina.

El ácido fenilacético se elimina en forma conjugada con la l-glutamina en el hombre y primates. Moldave y Meister (53) demostraron que la síntesis de la fenilacetilglutamina se realiza mediante la activación del fenilacetato con ATP, transfiriéndose después el grupo fenilacetilo, primero al coenzima A y luego a la glutamina.

El ácido fenilpirúvico puede también hidroxilarse en posición orto por acción de un sistema enzimático descrito por Taniguchi y Armstrong (54,55) para convertirse en ácido o-hidroxifenilpirúvico. La enzima que se utiliza en

1.A.4. Rutas alternativas del metabolismo de la fenilalanina.

La fenilalanina, además de su incorporación a las proteínas, se degrada siguiendo una vía principal pasando a tirosina. A parte de esto, se puede metabolizar a través de otras vías alternativas secundarias.

El paso secundario más importante es su transaminación para producir ácido fenilpirúvico, por acción de una transaminasa específica. Esta vía prácticamente no es utilizada en condiciones normales y es necesaria una concentración de fenilalanina plasmática superior a 0,5 mM para que pueda detectarse la presencia de ácido fenilpirúvico en la orina humana (49,50). El cofactor de la reacción es el piridoxal fosfato y el cosustrato el 2-cetoglutarato. Esta enzima es inducida por el sustrato pero no lo es por el cofactor ni por las hormonas esteroides en rata (51).

El ácido fenilpirúvico así formado es reducido a ácido fenilactico por una reductasa específica de los α -cetoácidos aromáticos (47), pero la mayor parte se descarboxila a ácido fenilacético, parte del cual se conjuga y transforma en fenilacetilglutamina.

El ácido fenilacético es el responsable del olor característico de la orina de los fenilcetonúricos, que llamó la atención de Folling (52) y cuya posterior investigación llevó al descubrimiento de la fenilcetonuria humana.

Otra posible fuente de ácido fenilacético podría ser a partir de la feniletilamina por acción de una aminooxidasa. La feniletilamina se forma por descarboxilación de la fenilalanina.

El ácido fenilacético se elimina en forma conjugada con la l-glutamina en el hombre y primates. Moldave y Meister (53) demostraron que la síntesis de la fenilacetilglutamina se realiza mediante la activación del fenilacetato con ATP, transfiriéndose después el grupo fenilacetilo, primero al coenzima A y luego a la glutamina.

El ácido fenilpirúvico puede también hidroxilarse en posición orto por acción de un sistema enzimático descrito por Taniguchi y Armstrong (54,55) para convertirse en ácido o-hidroxifenilpirúvico. La enzima que se utiliza en

la reacción es la p-hidroxifenilpiruvato oxidasa, similar a la que cataliza la formación de ácido homogentísico. El ácido o-hidroxifenilpirúvico así formado puede convertirse a continuación en ácido o-hidroxifenilacético (56) (Fig. 2).

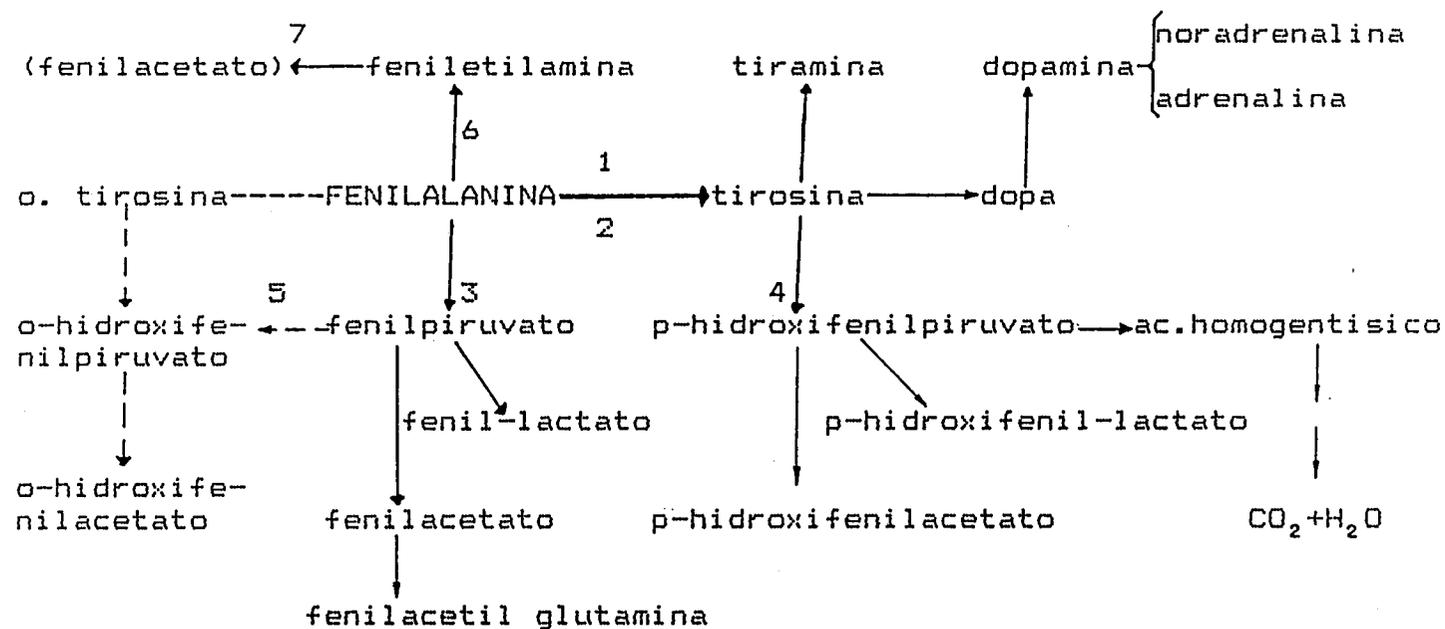


FIG.2. Vias Metabólicas de la Fenilalanina

- Enzimas: 1.-Fenilalanina hidroxilasa.
 2.-Dihidropteridina reductasa.
 3.-Fenilalanina glutamato aminotransferasa.
 4.-Tirosina glutamato aminotransferasa.
 5.-p-Hidroxifenilpiruvato oxidasa.
 6.-Fenilalanina descarboxilasa.
 7.-Feniletilamina oxidasa.

1.B. Hiperfenilalaninemia y fenilcetonuria clasica.

El término "hiperfenilalaninemia" envuelve un amplio espectro de desórdenes. Ya desde 1972 las dificultades en la diferenciación de la fenilcetonúria clásica de otras formas de hiperfenilalaninemia parece obvia.

El metabolismo de la Fenilalanina muestra una gran heterogeneidad genética, incluyendo variaciones en la actividad de la fenilalanina hidroxilasa, defectos enzimáticos en la ruta de la biopterina..etc.(Tabla I).

La definición estricta de la hiperfenilalaninemia es una cuestión de conveniencia. Con fines prácticos, en la evaluación de programas de "screening", se define la hiperfenilalaninemia como un incremento persistente de fenilalanina por encima de los límites normales más elevados. Para la mayoría de los centros de "screening" este valor debe ser superior a 4 mg/dl plasma (240 micromol/L)(57).

Tabla I

Posibles causas de Hiperfenilalaninemia.

1. Deficiencia de fenilalanina hidroxilasa.
2. Deficiencia de dihidropteridina reductasa.
3. Desórdenes en la síntesis de biopterina.
4. Descendientes de madres fenilcetonúricas.
5. Prematuridad.
6. Tirosinemia hereditaria.

1.B.1. Síndromes de la hiperfenilalaninemia.

Cuando se establecieron los sistemas de "screening" para establecer la fenilcetonúria el objeto era detectar y tratar niños que tenían fenilcetonúria clásica, pero empezó a ser evidente que un número significativo de ellos no eran fenilcetonúricos (58,59). La deficiencia en fenilalanina hidroxilasa era menos severa. Estos niños necesitaban ser distinguidos de los pacientes fenilcetonúricos ya que sus aptitudes eran distintas.

Así mismo se hizo evidente que algunos pacientes mostraban un defecto en el metabolismo de la tetrahydrobiopterina. En la Tabla II se presenta una clasificación de hiperfenilalaninemias que pueden ser encontradas en el curso de un "screening" neonatal y en la Tabla III se muestran las alteraciones que aparecen en la sangre y orina de dichos pacientes y su posible tratamiento.

Tabla II

Tipos de Hiperfenilalaninemias.

Tipo	Condición	Aspectos Clínicos	Defecto
I	Fenilcetonuria (PKU)	Retraso mental y síntomas asociados si no hay tratamiento.	Ausencia de fenilalanina hidroxilasa.
II	Hiperfenilalaninemia persistente.	Normal; en los casos severos sin tratar puede haber retraso mental.	Disminución de la actividad fenilalanina hidroxilasa.
III	Hiperfenilalaninemia transitoria débil.	Normal.	Retraso en maduración de la hidroxilasa.
IV	Deficiencia en dihidropteridina reductasa	Inicialmente normal. Ataques y desarrollo anormal al año de vida.	Deficiencia o ausencia de la dihidropteridina reductasa.
V	Funcionamiento anormal de la Dihidrobiopterina	Movimientos incontrolados, piel grasa, hipertermia recurrente	Defecto en la síntesis de dihidrobiopterina.
VI	Hiperfenilalaninemia y tirosinemia transitoria.	Progresiva ataxia y ataques entre los 12-18 meses.	Catabolismo de la tirosina.
VII	Tirosinemia neonatal transitoria.	Bajo peso al nacer, alta ingesta proteica.	Inhibición p-hidroxifenilpirúvico oxidasa.
VIII	Tirosinemia hereditaria	Enfermedad crónica hepática	Diversas deficiencias posteriormente.

Tabla III

Alteraciones analíticas y tratamiento de las distintas hiperfenilalaninemias.

Tipo	Fen y Tir en sangre	Orina	Tratamiento
I	Fen > 20 mg/100 dl con dieta regular. Tir = Normal-baja	Elevación de metabolitos de la Fe.	Dieta baja en Fen.
II	Al principio igual a PKU despues, Fen = 4-20mg/100 dl con dieta regular. Tir = Normal-baja	Aumento normal o transitorio de metabolitos de la Fen.	Ninguno o dieta terapeutica temporal.
III	Al principio igual a PKU; declina hasta normal la Fen. Tir = Normal	Igual a tipo II	Igual a tipo II
IV	Fen = variable, puede ser como en el tipo I. Tir = Normal	Variable, depende de la concentración en sangre y de la edad.	Dopa, 5-OH-triptofano carbidopa.
V	Fen = puede ser > 20mg/100dl. Tir = Normal	Anormal, Metabolitos, Biopterina.	Dopa, 5-OH-triptofano carbidopa
VI	Fen = 10 mg/100 dl Tir = elevada	Feniletilamina, ac. mandelico, p-OH-ac. mandelico	Ingesta reducida de Fen.
VII	Transitoriamente 4-12mg/100 dl la Fe. Tir = transitoriamente elevada 5-50/100 dl.	Espesa, aminoaciduria y metabolitos de Tir.	Vitamina C
VIII	Fen = 2-8mg/100 dl Tir = 4 mg/100 ml.	Dependiendo de la deficiencia, igual que VII, o 5-Aminolevulinato.	Dependiendo, dieta baja en Tir, o además inyecciones de glutatation.

1.B.1.1. Fenilcetonúria clásica o tipo I.

La oligofrenia fenilpirúvica ó fenilcetonuria (PKU) fué identificada por Folling en 1934 (52) que asoció el retraso mental que presentaban algunos pacientes con la anomalía bioquímica que suponía la excrección de ácido fenilpirúvico en la orina.

Ya en 1953 Jervis (60) comprobó un defecto en la conversión de la fenilalanina en tirosina en la biopsia hepática de los individuos fenilcetonúricos. Estos hechos fueron confirmados posteriormente por Wallace y col (61) y Kaufman(62).

La actividad fenilalanina hidroxilasa en hígado de pacientes fenilcetonúricos es aproximadamente 0,27% de la actividad normal. En contraste con la hidroxilasa de hígado de individuos normáles, ésta no se inhibe por fenilalanina 0,1 mM ni se estimula por lisolectina (63). El eccema es observado en aproximadamente el 25% de los pacientes no tratados durante el primer año de vida, el olor mohoso debido al ácido fenilacético ocurre también a esta edad temprana.

Pero es después del primer año de vida cuando aparecen los síntomas más alarmantes, el retraso psicomotor se hace evidente así como el fracaso para hablar y andar, ataques, hiperactividad, falta de pigmentación de pelo e iris, microcefalia, anomalías del electroencefalograma, descalcificación de los huesos largos..etc(64). En el 96 al 98% de los pacientes no tratados existe un retraso mental considerable.

1.B.1.2. Hiperfenilalaninemia tipos II y III.

En estos casos nos encontramos con una concentración de fenilalanina en sangre que oscila entre 4 a 10 mg/dl. En general aunque no invariablemente, la actividad hidroxilasa de hígado está en correlación con el nivel de fenilalanina en sangre (65). La actividad enzimática en estos pacientes varía del 1,5 al 34,5% de la actividad normal (65,66).

En relación a esta variación en los niveles de actividad hidroxilasa es preciso ajustar la dieta terapéutica para lo cual es necesario realizar el test de

sobrecarga de fenilalanina entre los 4 y 6 meses y después entre los 12 y los 18 meses con objeto de determinar que niños requieren una continuación de la dieta.

1.B.1.3. Hiperfenilalaninurias debidas a defectos en el coenzima. Tipos IV y V.

Un importante avance en el entendimiento de la hiperfenilalaninemia ha sido el descubrimiento de los defectos asociados con la deficiencia del coenzima de la fenilalanina hidroxilasa, la tetrahydropterina.

La deficiencia en dihydropteridina reductasa fue al principio demostrada (67) en un paciente con dificultades alimentarias después del nacimiento, puesto que los ataques progresivos en el periodo neonatal, retraso en el desarrollo a los 5 meses de edad y fracaso del control de los síntomas que no se consiguieron frenar a pesar de utilizar una dieta baja en fenilalanina (68)

Leeming y col (69) encontraron un defecto diferente en un niño con niveles sanguíneos de fenilalanina de 30 mg/dl a los 7 días de edad y 49 mg/dl a los 13 días y con síntomas distintos a los usuales. Estudios posteriores confirmaron que este nuevo defecto era debido a un defecto en la dihydrobiopterina sintetasa (70,71).

No está claro que cada uno de los defectos en la síntesis de biopterina esté localizado en el mismo lugar de la etapa enzimática. Teóricamente cada una de las secuencias de la etapa puede tener un lugar de mutación, con el mismo resultado de hiperfenilalaninemia.

Estas formas de alteración del metabolismo de la fenilalanina suponen del 1 al 3% de las hiperfenilalaninurias. Son particularmente importantes porque sin tratamiento sus consecuencias son fatales (67,69) y porque el modo de tratamiento es diferente de las hiperfenilalaninurias usuales (72,73).

1.B.1.4. Tirosinemia.

Rennert y col.(74) describieron el caso de dos hermanos con incrementos de fenilalanina y tirosina en el plasma y con progresivo deterioro clínico, con ataxia y ataques que aparecieron entre 12 y 18 meses de edad. Tenían unas concentraciones urinarias incrementadas en

feniletilamina, ácido mandélico y ácido p-hidroximandélico. Estos niños sobrevivieron sin ulterior deterioro con una dieta de moderada ingesta de fenilalanina(75). Es frecuente encontrarla en niños prematuros lo cual pone de manifiesto la existencia de hiperfenilalaninemias secundarias como consecuencia de las tirosinemias hereditarias . De aquí la necesidad de medir la tirosina cuando los niveles de fenilalanina se encuentran elevados.

1.B.2. Patogénesis.

A pesar de los numerosos trabajos de investigación al respecto, las causas del retraso mental que acompaña a la enfermedad permanecen desconocidas. Se han formulado innumerables hipótesis al respecto, como son, disminución de la concentración de serotonina, déficit en la mielinización o bien aumento de la concentración de feniletilamina.

La terapia mejora considerablemente casi todos los síntomas de la enfermedad, eccemas, convulsiones, etc. pero el retraso mental de niños mayores de tres años no mejora con el régimen terapéutico (76). Es necesario un diagnóstico precoz de la enfermedad, para que el tratamiento inmediato evite el daño cerebral.

1.B.2.1. Alteraciones a nivel del metabolismo lipídico y proteico en cerebro. Importancia del colesterol en la mielinización.

Anatómicamente, se ha demostrado una reducción de la masa cerebral (77,78,79). Ya en 1950 Alvord y col. sugirieron que un retraso en la mielinización era la mayor anomalía neuropatológica encontrada en la fenilcetonuria (77). Desde entonces numerosos autores han indicado una reducida mielinización en los pacientes (78) y este hecho se ha reproducido en condiciones de hiperfenilalaninemia experimental.

La mayoría de las células del sistema nervioso de los vertebrados se hallan recubiertas por las vainas de mielina, que están formadas por enrollamiento de las correspondientes células gliales (oligodendrocitos en el caso del S.N.C. y células de Schwann en el periférico) alrededor del axón. Mientras esto ocurre, el citoplasma de la región enrollada desaparece y las membranas plasmáticas entran en mutuo contacto. El espacio intercelular situado entre vueltas sucesivas disminuye hasta que las membranas plasmáticas se unen unas con otras. De esta manera los componentes de la vaina de mielina son esencialmente los componentes de las membranas plasmáticas de las células gliales.

Los primeros estudios de Schmidt y Fernandez Moran (80) demostraron que la mielina está constituida por capas alternas de lípidos y proteínas. En la membrana de mielina la proporción es 20-30% de proteínas y 70-80% de lípidos. Cada proteína puede interactuar con muchas moléculas lipídicas y llevar a cabo su misión como complejo lípido-proteína.

En la mielina humana se han aislado dos grupos de proteínas mayoritarias constituidos por proteolípidos y proteínas básicas. Wolgram también caracterizó unas proteínas de alto peso molecular en la fracción de mielina (81).

La interacción de las proteínas con los lípidos es claramente importante para la estabilidad de la mielina. Por tanto, una alteración en lípidos o proteínas puede afectar marcadamente la arquitectura y la estabilidad de la membrana de mielina (82). La biogénesis de la mielina implica la adición coordinada de lípidos y proteínas a la estructura membranosa en formación.

Durante la mielinización el contenido lipídico total no varía, pero se observan alteraciones importantes en la proporción de determinadas clases de lípidos del cerebro como esfingolípidos y fosfolípidos (81).

Con respecto a la composición de la fracción lipídica podemos afirmar que ésta es aproximadamente colesterol:fosfolípidos:galactolípidos en una proporción de 4:3:2.

El colesterol es por tanto uno de los constituyentes esenciales de las membranas biológicas y se encuentra en una concentración particularmente alta en la mielina, constituyendo el 25-28% de los lípidos totales (83).

Parte del colesterol presente en la mielina proviene del plasma sanguíneo (colesterol exógeno) pero la mayor proporción del mismo es sintetizado "in situ" en las propias células del sistema nervioso (colesterol endógeno) (84,85).

La necesidad de cantidades normales de colesterol para el funcionamiento de las membranas se puede deducir de los conocimientos que se tienen del papel que cumple este componente, influyendo entre otras cosas en las propiedades de permeabilidad de las bicapas de lípidos (86) y de las membranas celulares (87).

Análisis cuantitativos realizados por Rawling y col. (88,89) a nivel de microscopía electrónica indican que la inhibición de la síntesis de colesterol durante el periodo de pre-mielinización dá lugar a un retardo en la mielinización tanto del nervio ciático como del nervio óptico.

El unico esteroles que hasta el momento se ha detectado en la mielina del animal adulto es el colesterol libre si bien en la mielina de ratas inmaduras se encuentran además trazas de desmosterol, precursor inmediato del colesterol, el cual desaparece de la mielina a los 20 días aproximadamente(90).

De estudios realizados utilizando ratas jóvenes y adultas tratadas con un inhibidor de la biosíntesis del colesterol (91) se concluye que parte del colesterol presente en la mielina, tanto del animal joven como del adulto, puede ser sustituido por otros esteroides, entre ellos el 7-deshidrocolesterol. Sin embargo estos esteroides son menos eficientes que el colesterol en la formación y mantenimiento de la mielina.

Estos resultados indican además, a diferencia de lo aceptado comunmente, que parte del colesterol de la mielina adulta se encuentra en constante recirculación o intercambio con el colesterol cerebral y en este caso también con su precursor el 7-deshidrocolesterol presente en otros compartimentos del sistema nervioso, probablemente en la fracción microsomal, pues existen evidencias de que es en esta fracción donde se sintetiza el colesterol usado por la mielina(92).

El colesterol endógeno es totalmente indispensable durante cualquiera de los periodos por los que atraviesa el desarrollo de la mielina en el cerebro. Así, ratas tratadas con un inhibidor de su biosíntesis muestran (91):

- a) Una disminución de la cantidad total de mielina producida por el cerebro.
- b) Una sustitución de parte del colesterol, normalmente presente en la mielina, por 7-deshidrocolesterol junto con otros esteroides no identificados, en el caso en que las ratas sean tratadas durante la pre-mielinización.

La inhibición ó retardo en la formación de mielina, o su parcial desintegración, así como alteraciones en su estructura o composición química, dan lugar a trastornos neurológicos graves. Los animales tratados con un inhibidor de la biosíntesis del colesterol (AY-9944) durante la premielinización mostraron temblor continuo e incoordinación de los movimientos, sintomatología similar a la observada en ciertas cepas de ratones tales como los Wabblerslethal, Gimpy y Quaking, los cuales poseen defectos hereditarios caracterizados por una disminución en la cantidad de mielina en ciertos tractos del sistema nervioso central (93,94).

La maduración del cerebro se encuentra asociada al proceso de mielinización de tal forma que éste puede ser usado como excelente parámetro indicador del grado de desarrollo alcanzado por el sistema nervioso en un momento determinado. Este proceso de mielinización ocurre en la etapa final del desarrollo embrionario y en algunos animales se prolonga durante algún tiempo después del nacimiento, como en el caso de la rata y el ratón que han sido los animales más estudiados.

El desarrollo de la mielina en el hombre comienza antes del nacimiento y continúa durante varios años después. Durante este período la proliferación glial y el depósito de mielina coinciden con un incremento en la coordinación de los movimientos. En el pollo, animal de experimentación usado en nuestro trabajo ocurre durante el final de la fase embrionaria, con lo cual este animal nace virtualmente mielinizado.

Se ha demostrado que la adquisición de la cantidad normal de mielina en un animal adulto puede estar limitada por la disminución de ciertos factores nutricionales, por modificación de ciertas hormonas, así como por modificación de la síntesis de ciertos componentes esenciales. Todos estos factores tienen como efecto un subdesarrollo del sistema nervioso.

La premielinización y la más rápida mielinización durante el desarrollo cerebral han sido preferentemente estudiados, ya que hasta hace poco tiempo se creía que en el animal adulto no había formación de nueva mielina. Actualmente existen evidencias de que la mielinización es un proceso que de alguna forma continúa durante toda la vida del animal (100)

En lo referente al metabolismo lipídico, Crome (101) observó una disminución en las concentraciones de colesterol y cerebrosidos en los pacientes fenilcetonúricos, resultados que no fueron confirmados más tarde por Foote y col (102).

Desde entonces se han tenido numerosas evidencias, sobre todo con los trabajos de Shah y col., de que una de las causas que más satisfactoriamente podría explicar el retraso mental en la hiperfenilalaninemia es precisamente una disminución de la biosíntesis del colesterol que tendría como resultado una hipomielinización.

Gerst y Malamud (103) confirmaron las observaciones de Crome de una disminución en el contenido de colesterol en pacientes fenilcetonúricos. Menkes observó pequeñas pero consistentes variaciones en la composición lipídica que principalmente suponían un incremento en la relación de hidroxiácidos y no hidroxiácidos de los sulfátidos.

De acuerdo con Shah y col. (104) en la hiperfenilalaninemia existe un efecto producido por las altas concentraciones de fenilalanina sobre el metabolismo lipídico, consistente en la reducción de la incorporación "in vivo" e "in vitro" de glucosa a lípidos cerebrales. Los metabolitos de la fenilalanina son en general mejores inhibidores, siendo el fenilactico en comparación al fenilacético o fenilpirúvico el inhibidor más potente de la incorporación "in vitro" de glucosa marcada a lípidos cerebrales. Estos mismos autores realizaron más tarde trabajos encaminados a demostrar que altos niveles de fenilalanina inhibían la incorporación de ácido mevalónico a esteroides cerebrales. Esta inhibición era debida a los metabolitos derivados de la fenilalanina más que a esta en si (105).

Por lo tanto, una hiperfenilalaninemia prolongada en ratas inmaduras puede producir unos niveles anormales de colesterol cerebral, debido probablemente a la acumulación cerebral de fenilpirúvico, fenilactico y fenilacético lo cual provocaría una reducción en la incorporación de MVA a colesterol.

Ranganathan y Ramasarma (106) encontraron que varios compuestos fenílicos y fenólicos inhibían la incorporación de mevalonato a esteroides en hígado de rata. Un metabolito de la tirosina, el p-hidroxicinamato, era el inhibidor más potente. La presencia de un anillo aromático y un grupo carboxilo en la molécula parece ser

necesario para esta inhibición.

Partiendo de la base de que en hiperfenilalaninemia el metabolismo de la tirosina se encuentra también afectado, como lo demuestra el caso de que sujetos fenilcetonúricos excretan grandes cantidades de p-hidroxifenilacetico y p-hidroxifenillactato (107) se pone de manifiesto que en estos casos los metabolitos de la tirosina pueden ser potenciales agentes inhibidores de la biosíntesis del colesterol.

Más tarde Bhat y Ramasarma (108) relacionaron algunos compuestos fenólicos y fenílicos entre los que se encuentran varios metabolitos de la fenilalanina con la inhibición que estos mismos producen sobre algunas enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol. El lugar de inhibición se localizó entre el mevalónico y el isopentenil pirofosfato. De esta forma, pusieron de manifiesto que la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa de hígado de rata es inhibida por varios ácidos fenólicos y fenílicos, algunos de los cuales también inhiben la enzima fosfomevalonato cinasa bajo determinadas condiciones, pero no inhiben la mevalonato cinasa. Según estos autores, los compuestos con estructura fenil-vinílica son los inhibidores más potentes.

Por otra parte, estudios cinéticos muestran que algunos ácidos fenólicos compiten con los sustratos 5-fosfomevalonato y 5-pirofosfomevalonato, mientras que otros inhiben no competitivamente. De entre los primeros destacan los ácidos p-cumarico, el ácido m-cumarico, isoferulico y ferulico por el más alto efecto ejercido; de entre los segundos destacan el ácido fenillactico y el ácido fenilpirúvico.

De estos importantes descubrimientos se deduce puesto que la concentración en plasma de la fenilalanina y sus metabolitos oscila entre 1 y 4 mM, que se puede afectar la biogénesis hepática del colesterol por afectación de las mencionadas enzimas.

En nuestro Departamento, Alejandre y col. (109) han puesto recientemente de manifiesto en embriones de pollo a los que se les había inducido una hiperfenilalaninemia experimental una inhibición de la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa de cerebro, mientras que la HMG-CoA reductasa, MVA cinasa y PMVA cinasa de cerebro no parecen afectarse. Las cuatro enzimas no

parecen afectarse en hígado. Estos estudios ponen de manifiesto el posible papel ejercido por la descarboxilasa en la regulación de la biosíntesis del colesterol durante la mielinización.

En relación con la incorporación reducida de glucosa a lípidos y proteínas, Mitoma y Valley (110) apuntaron que la causa sería una defectuosa utilización de la glucosa debida a los altos niveles de fenilalanina y de sus metabolitos, ya que la entrada de α -metil-D-glucosa ó glucosa a cerebro no está dificultada en ratas con hiperfenilalaninemia inducida.

Dado que la interacción lípido-proteínas contribuye a la estabilidad de la mielina, es probable que los sulfátidos y otros ácidos lipídicos protejan a las proteínas básicas de la mielina de ataques proteolíticos (111). Las anomalías en la síntesis de los sulfátidos (112,113,114) demostradas en hiperfenilalaninemia experimental ofrecen una explicación plausible para la disminución de la estabilidad.

Por otra parte el metabolismo lipídico anormal puede conducir a una mielina inestable, o bien, el incremento del "turnover" proteico conducir a una incorporación y ensamblaje anormal de lípidos en la mielina. En relación con la mielina Grundt y Hole (115) demostraron que en homogenados de cerebro no se encontraban diferencias significativas entre animales con hiperfenilalaninemia inducida y los controles. Sin embargo en mielina aislada se encontraron concentraciones anormales de proteínas y lípidos. Estos descubrimientos se interpretaron como indicativos de un descenso en la proporción de mielinización sin cambios en la composición de la mielina. Esta deficiencia en la cantidad o proporción de mielina fue interpretada por Shah y col. (116) como la causa de una temprana detención de la mielinización, al observar la ausencia de ésteres del colesterol en la materia blanca de cerebro de ratas hiperfenilalaninémicas.

Por último, los trabajos realizados en embrión de pollo por Alexandre y col. (117) indican con respecto al contenido lipídico de la mielina cerebral, que no existen diferencias significativas en el contenido lipídico de la mielina, aunque sí se encontró un claro incremento en el porcentaje de colesterol esterificado. La actividad 2'3'-cíclico-nucleotido 3'-fosfohidrolasa (CNF), enzima marcadora de la mielina, fué significativamente menor en mielina de embriones tratados en comparación con los

controles.

Otra explicación al déficit en la producción de mielina ha sido propuesta por Huethe y Neuhof (118), según los cuales, éste se produciría secundariamente al fenómeno de alteración en la diferenciación de las neuronas. El número de células en el cerebro en desarrollo, especialmente de las formadas postnatalmente, se encuentra reducido, sugiriendo una escasa proliferación. Así mismo ponen de manifiesto un incremento en la actividad enzimática lisosomal, lo que añade un incremento adicional de la muerte celular.

De entre los metabolitos de la fenilalanina, numerosos investigadores han subrayado el papel del fenilacético en la producción de distintos desórdenes. Así, el contenido cerebral de los gangliósidos fue reducido aproximadamente en un 40% en hiperfenilalaninemia experimental. Un descenso similar fue observado en ratas expuestas a fenilacetato pero no en animales inyectados con fenilpirúvico (119)

En una serie de investigaciones Loo y col (120) han demostrado claramente que el fenilacetato producido en cantidades excesivas en hiperfenilalaninemia, induce características clínicas similares a PKU en ratas que poseen niveles normales de fenilalanina en cerebro.

El desarrollo deficiente de las sinapsis puede contribuir a explicar satisfactoriamente el déficit de la función cognoscitiva. El fenilacetato parece afectar al sistema nervioso produciendo una deficiente formación de las sinapsis (122) hipótesis que se apoya en consideraciones morfológicas.

Hogan y Coleman en 1981 destacaron un pobre desarrollo y una escasa ramificación del árbol dendrítico en hiperfenilalaninemia inducida a ratas (123,124). Los mismos resultados fueron puestos de manifiesto en ratas previamente expuestas a fenilacetato (125). Por otro lado, se ha apuntado una falta de maduración dendrítica espinal provocada mediante inyecciones de fenilacetato, siendo estos efectos reversibles en ratas al finalizar el tratamiento (126)

Una disminución en la densidad de las sinapsis fue observada en cerebro de ratas tratadas con α -metil fenilalanina y fenilalanina (127) y en cerebelo de ratas expuestas a fenilacético (128). Estas observaciones las

confirman los estudios de Bauman y col. en cerebro de individuos PKU no tratados (129). El tratamiento con fenilpiruvato no produce ningun efecto en la formación de las sinapsis cerebrales (130,131,132).

Las investigaciones de Loo y col ponen énfasis en que realmente es el alto contenido el fenilacético la primera cusa de disfunción cerebral, siendo el responsable del retardo del crecimiento cerebral de fetos de ratas hiperfenilalaninemicas (133).

Estos autores atribuyen al fenilacetato una acción neurotóxica a través de su producto metabólico fenilacetil-CoA que puede descender severamente la disponibilidad de acetil-CoA (134). Recientemente han puesto de manifiesto que el fenilacético contribuye significativamente al retraso en la maduración del cerebro enfatizando en que el mecanismo de su neurotoxicidad seria el de inhibición en la utilización del acetil-CoA en ciertas reacciones metabólicas como por ejemplo la síntesis de ácidos grasos y de esteroides (134).

El fenilpirúvico es considerado también como responsable de desórdenes neurológicos. En este sentido, la fenilalanina y el fenilpiruvato impiden la fosforilación de la glucosa y la producción de lactato en cortes cerebrales de rata durante la diferenciación (135). Además se ha demostrado que el fenilpiruvato interfiere en la utilización de la glucosa para la síntesis lipídica (104,135,136,137) así como en la oxidación del piruvato.

Según Bowden (138) la depresión del metabolismo del piruvato haría disminuir la cantidad de acetil-CoA utilizable para la síntesis de ácidos grasos y colesterol, los cuales son precursores de la mielina. Glazer y col. también han demostrado que el fenilpirúvico inhibe a la enzima piruvato kinasa y la lactato deshidrogenasa (139).

Por último, un nuevo derivado de la fenilalanina (N-(4-metil-Benzil-tiocarbonil)-l-fenilalanina) fue administrado en distintas concentraciones a ratas demostrándose que inhibía la incorporación de ¹⁴C-acetato a esteroides en cortes hepáticos u homogenados, produciendo una inhibición en la actividad HMG-CoA reductasa relacionada con la reducción en la incorporación de C-acetato a esteroides precipitables (140). Los efectos de este nuevo derivado se producían también "in vivo" situándose su principal sitio de acción a nivel de la HMG-CoA reductasa.

1.B.2.2. Alteraciones a nivel del metabolismo de aminoácidos y derivados.

La consecuencia inmediata de la inhibición de la fenilalanina hidroxilasa hepática es la elevación de los niveles de fenilalanina. La concentración en plasma de los pacientes oscila entre 1 y 2,5 mM. Por el contrario, la concentración de otros aminoácidos decrece (141) de forma tal que el nitrógeno amínico se mantiene dentro del intervalo normal.

Se ha puesto de manifiesto un defecto en la adsorción intestinal del triptofano (142,143) como lo prueba la baja concentración plasmática del mismo. Con respecto a la glutamína, se ha observado una disminución de la glutamina serica (144) aunque existen niveles incrementados en liquido cefalorraquideo (145).

Estudios realizados en 29 niños de 9 a 30 días de edad, con fenilcetonúria confirmada (146), demuestran una reducción en plasma de algunos aminoácidos como treonina y tirosina. En fluido cerebroespinal, las concentraciones de treonina, alanina y arginina se encontraban también reducidas, mientras que serina, isoleucina e histidina estaban elevadas. Esta combinada deficiencia y exceso de aminoácidos en el S.N.C. puede tener un efecto significativo en la síntesis proteica en una edad en la cual dicha síntesis y el "turnover" son más activos.

Efrom y col (147) encontraron una depresión significativa de todos los aminoácidos neutros en hiperfenilalaninemia y una depresión aún más marcada fue encontrada por Lynnewch y Ehrlich (148).

Según Karsten y col (149) de 41 niños tratados tempranamente con dieta terapéutica de hiperfenilalaninemia (PKU y variantes), todos muestran una desviación en el patrón plasmático de aminoácidos. Existen bajos niveles de arginina en los pacientes más jóvenes y elevados niveles de lisina, serina e histidina en todos los grupos de niños de diferentes edades estudiadas.

Otros trabajos (150-152) sugieren, como posible causa del retraso mental el deficit de uno o más aminoácidos esenciales requeridos para la síntesis de

proteínas en el S.N.C. déficit que puede ser producido por una competencia entre las altas concentraciones de fenilalanina y otros aminoácidos por el sistema común de transporte en el S.N.C. Así, altas concentraciones de fenilalanina en plasma inhiben la captación por el cerebro de metionina y leucina (153), leucina (110) ó en general la captación de aminoácidos alifáticos de cadena ramificada (154) probablemente como resultado de la inhibición por fenilalanina del sistema común de transporte de estos aminoácidos.

Por otra parte, Clifford y col. (155) han confirmado un descenso en los niveles de metionina y aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) en ratas hiperfenilalaninémicas.

La fenilalanina no interfiere en la captación de glicina por el cerebro (153) y en este sentido se ha demostrado, en ratas expuestas a una hiperfenilalaninemia prolongada, una elevación en el contenido cerebral de glicina (156,157) que es un inhibidor de neurotransmisores. Isaacs y Greengard, han confirmado esta elevación de glicina en el cerebro en desarrollo de rata (158), y proponen que la hiperfenilalaninemia crónica aparentemente interfiere con la regulación normal del metabolismo intracerebral de glicina durante el periodo crítico de desarrollo en rata.

En nuestro laboratorio, Marco y col. (159) trabajando con embrión de pollo hiperfenilalaninémico, han puesto también de manifiesto un incremento de glicina en plasma y cerebro, mientras que en hígado no varía. Así mismo demuestran alteraciones en las concentraciones de aminoácidos alifáticos de cadena ramificada (valina, isoleucina y leucina), estando sus concentraciones incrementadas en plasma e hígado y no encontrando variación en cerebro.

Huether y Neuhoff (118) observan en rata un incremento de GABA en cerebro, otro aminoácido considerado inhibidor de los neurotransmisores.

Es posible que la competencia de la fenilalanina y otros aminoácidos por el mismo sistema de transporte en la barrera hematoencefálica sea la responsable de la limitada disponibilidad de otros aminoácidos y en consecuencia de una síntesis defectuosa de proteínas en cerebro de pacientes fenilcetonúricos que daría lugar a un desarrollo anormal del mismo (150,151,152).

Las condiciones normales podrian restaurarse por suplementación de los aminoácidos neutros que se encontraran más disminuidos en cerebro. Basados en estas observaciones, una dieta con suplementación de aminoácidos neutros ha sido propuesta y aplicada (160,161).

Trabajos realizados con fetos de ratas gestantes con hiperfenilalaninemia inducida, han demostrado que una dieta con isoleucina al 3% reduce el retraso en el desarrollo y crecimiento que normalmente se observa en estos casos.

En ratas gestantes a las que se les habia inducido hiperfenilalaninemia la inyección de lisina previene el descenso en aminoácidos en sangre y cerebro, asi como el retraso en el crecimiento del cerebro. Esto sugiere que ambos aminoácidos fenilalanina y lisina son sustratos importantes en la etapa limitante del rápido anabolismo proteico en el desarrollo tisular (162).

Cargas nutricionales de aminoácidos, particularmente de fenilalanina han sido usadas para estudiar ciertos desórdenes metabólicos. Así, Waisman y col. encontraron que dietas suplementadas con l-histidina y administradas a monos jóvenes, daban como resultado una marcada hiperlipémia (163,164).

Por otra parte, la histidina es el único aminoácido de los 9 estudiados que induce esta hiperlipémia. Los fosfolípidos en suero se incrementaron 2 veces, los triglicéridos de 3 a 8 veces y el colesterol de 2 a 3 veces. Más tarde Geison y Waisman (165) comprobaron que dietas con un 5% y un 8% de exceso de l-histidina administradas a conejos de 4 semanas de edad, inducian un incremento en los niveles de colesterol plasmático. Por otra parte, ratas tratadas con una dieta suplementada al 5% con l-histidina desarrollaban hígado graso e hipercolesterolemia (166), produciéndose un incremento de incorporación de precursores del colesterol a colesterol en cortes hepáticos

Estudios previos habian demostrado una disminución en la síntesis de colesterol a partir de acetato en ratas alimentadas con una dieta suplementada con histidina, observándose que cuando se imponía de nuevo una dieta normal, los valores retornaban a la normalidad.

De igual modo, Asaf y col. (167) investigaron los efectos de suplementación de histidina sobre la síntesis de colesterol a partir de acetato y mevalonato en ratas con dieta normal y ratas con dieta libre de grasa. Los resultados sugieren que la histidina probablemente ejerce un efecto sobre enzimas que intervienen en la etapa metabólica entre el mevalónico y el colesterol, ya que la incorporación de ¹⁴C-mevalónico a insaponificables se incrementaba 7 veces. En los casos de dietas libres de grasas no se afectaba la incorporación.

Por otra parte, se ha observado que el ácido fenilpirúvico a una concentración de 0,1 mM inhibe la descarboxilación de la DOPA (168), pudiéndose originar una concentración deficiente de adrenalina.

El ácido o-hidroxifenilacético inhibe "in vitro" a la glutamato descarboxilasa cerebral (169); sin embargo, "in vivo" no se ha podido confirmar la disminución de los niveles de ácido 4-aminibutírico, como correspondería a la inhibición de dicha descarboxilasa.

Con respecto a la disminución de la concentración de serotonina, Pare y col. (170) comprobaron en efecto una disminución de serotonina en suero y del 5-hidroxi indolacético excretado. Numerosos autores (171-174) siguieron investigando en esta línea, llegándose a la conclusión de que una inhibición en el transporte del 5-hidroxitriptófano y la reducción de la triptófano hidroxilasa podrían ser las causas de los bajos niveles de serotonina.

Wolley (175) apoyó esta hipótesis en sus trabajos, pero más tarde numerosas evidencias demostraban que la reducción de serotonina cerebral por si misma no explicaba los distintos síntomas neurológicos (176).

1.B.3. Modelos experimentales de hiperfenilalaninemia.

Se han realizado numerosos trabajos con el fin de obtener un modelo válido para la producción de fenilcetonúria ó hiperfenilalaninemia en animales de experimentación.

El procedimiento utilizado inicialmente fue la administración en la dieta (5-7%) o intraperitonealmente (1mg/g.de peso) de fenilalanina. Los primeros trabajos en este sentido fueron realizados por Auerbach y col (177). Las consecuencias inmediatas de la administración de fenilalanina son la elevación de los niveles de este aminoácido en la sangre (178,179) la excreción de sus metabolitos en orina y la aparición de trastornos psicológicos en los animales de experimentación (177,180,181).

La inyección diaria de fenilalanina produce varias alteraciones características de esta enfermedad como; alteración del metabolismo de la fenilalanina, (178) y del del triptófano (182) defectos en la formación de serotonina (181,183), alteraciones en la concentración de aminoácidos en plasma y cerebro (178,184), del DNA (184,185), alteraciones en la composición de los lípidos cerebrales (105,186,187) 3,254) y reducción de la incorporación de glucosa en los glucolípidos cerebrales (104,188).

En este sentido, Frensky y col (189), inyectando l-fenilalanina en una proporción de 4 mg/g de peso corporal y día, comprobaron que se producía además de una reducción en el contenido lipídico (65,2% de los valores controles), un descenso en el contenido de DNA y RNA así como del total de proteínas. Según estos autores, la reducción del contenido en colesterol y fosfolípidos fue aproximadamente similar al descenso en lípidos totales, mientras que los galactolípidos y proteolípidos sufrían una reducción algo más drástica. En cuanto al contenido de proteínas totales, se producía un descenso tanto en cerebelo como en cerebro de los animales tratados. El DNA así como el RNA de cerebelo sufrían una disminución con respecto a los animales controles. En cerebro solo el RNA exhibía diferencias significativas.

Sin embargo, el modelo de experimentación no parece ser el adecuado para reproducir la enfermedad humana, ya que todas las ratas tratadas presentan elevadas concentraciones de tirosina en el plasma, llegando en algunos casos a ser sus niveles superiores a los de la

propia fenilalanina (178). Esto es debido a que en los animales tratados según este procedimiento no se consigue el defecto básico de la enfermedad, es decir, la inhibición de la fenilalanina hidroxilasa.

También se han utilizado en épocas anteriores como modelos los ratones homocigotos al gen letal diluido ("d"), a partir del que Searle (190) descubrió los efectos del gen mutante, y que Coleman (191) comparó encontrando similitudes clínicas entre esta enfermedad de los ratones y la fenilcetonúria. No obstante, la experimentación posterior ha señalado que no constituyen modelo experimental adecuado para el estudio de la fenilcetonúria o cualquiera de sus variantes.

Las investigaciones se centraron entonces en los estudios para encontrar inhibidores específicos del sistema hidroxilante de la fenilalanina.

De Graw y col (192,193,194) encontraron la esculetina (6-7-dihidroxycumarina) y la p-fluor-fenilalanina como inhibidores del sistema. La esculina (6-glucosil-esculetina) a pesar de ser peor inhibidor que la esculetina en los ensayos "in vitro" tenía una mayor eficacia en los estudios "in vivo". El mecanismo de inhibición de la esculetina y la esculina según De Graw y col (192) puede ser por competencia con el cofactor de la reacción la tetrahidropteridina.

Koe y Weisman en 1966 (195) descubrieron la p-cloro-fenilalanina (PCPA) como potente inhibidor de las hidroxilasas del triptófano y la fenilalanina y Lipton y col. (196) propusieron su uso para simular la fenilcetonuria en ratas.

De Graw y col. (192) comprobaron que los efectos de inhibición de la PCPA permanecían constantes durante tres días después del tratamiento, y Guroff (197) estableció que el máximo de inhibición de la fenilalanina hidroxilasa se producía entre las 24 y 48 horas de la administración de la droga, y que la etionina o la puromicina prolongan durante algún tiempo la inhibición debida a la PCPA.

Las formas D y L de la PCPA producen efectos similares y de la misma magnitud que las observadas para la forma racémica DL. El mecanismo por el cual la PCPA actúa sobre la fenilalanina hidroxilasa podría explicarse según Gal y col. (198) por la incorporación de este aminoácido anormal en la molécula enzimática en una posición crucial de la secuencia de aminoácidos.

La PCPA produce importantes cambios bioquímicos, así como numerosos efectos sobre la conducta de los animales; reducción del sueño, depresión motora (194,199) etc. Este procedimiento de inducción de un modelo de experimentación animal ha sido muy utilizado (200,201,201,203,204).

Un modelo consistente en la administración de PCPA y esculina más fenilalanina fue propuesto por Valdivieso en 1973 (205).

Sin embargo, no queda claro el que las anomalías en ratas tratadas con PCPA sean debidas a la condición de hiperfenilalaninemia por si, debido a los efectos tóxicos de la propia PCPA (206,207,208). Estos efectos tóxicos incluyen deterioro del crecimiento en general, mortalidad incrementada y cerebro afectado de una monoamina biogénica neurotransmisora (209).

En cultivos celulares la PCPA produce un efecto tóxico, inhibiendo el desarrollo proporcional de las células (207). A la vista de la acción no específica y citotóxica se deduce que el modelo de utilización de PCPA es inadecuado para la producción de hiperfenilalaninemia experimental en animales.

En 1976 Greengard y col. (210) propusieron un nuevo modelo de inducción de hiperfenilalaninemia basado en la utilización de un nuevo inhibidor de la actividad fenilalanina hidroxilasa, la α -metil- fenilalanina (MPA), más fenilalanina. Este nuevo modelo reproduce las condiciones clínicas, su especificidad es más alta y su toxicidad menor (210,211).

Al estar libre de efectos no específicos, los cambios observados en los animales pueden atribuirse a hiperfenilalaninemia experimental. Con este modelo se produce un suave descenso del peso del cuerpo y cerebro de los animales que a su vez exhiben elevados niveles de fenilalanina en suero y excrección urinaria de metabolitos. De igual forma se produce una desviación de los niveles de aminoácidos, cambios en las concentraciones en glicina, γ -aminobutírico y aminoácidos alifáticos y aromáticos. Estos animales también poseen un déficit de mielina y cambios en las proteínas del cerebro, así como una reducción en los niveles de ácidos grasos insaturados.

Todas estas observaciones son concordantes con algunos aspectos del cuadro clínico de fenilcetonúricos no tratados y sugieren que este modelo experimental puede ser de gran utilidad en el estudio de la enfermedad (209). Desde que se propuso este modelo, numerosos autores lo han utilizado en sus investigaciones (114,118,212,213,214).

La presencia de α -metil- fenilalanina en ratones recién nacidos inhibe la fenilalanina hidroxilasa un 65-70% con una dosis de 0,43 ng/g de peso corporal, durante 12 horas. Para mantener el descenso de actividad enzimática durante 24 horas, es necesaria una administración diaria. Adicionalmente se administra fenilalanina en una dosis de 2mg/g de peso corporal (215).

La utilización de MPA como inhibidor de la fenilalanina hidroxilasa produce en ratas un descenso de un 15% en las proteínas de la mielina. El turnover de proteína del cerebro no se afecta, pero el turnover de proteínas de la mielina se incrementa (216).

Por otro lado Binek y col (215), utilizando el mismo modelo han puesto de manifiesto una reducción proporcional del alargamiento de la cadena de los polipeptidos en polirribosomas aislados de homogenados cerebrales.

Así mismo en ratas tratadas con MPA se observa una reducción en el contenido de DNA en el cerebro, pero no en cerebelo. La síntesis de DNA en el cerebro se afecta en ratas de 11 días pero no a los 21 días de edad. Tampoco se afecta la síntesis de DNA en el cerebelo, mientras que la degradación del DNA no se altera ni en cerebelo ni en cerebro.

Howard Taylor al proponer como modelo para el estudio del metabolismo en la mielina la administración de una dieta consistente en 5% de Fenilalanina y 0,4% de α -metil- fenilalanina a ratas de 25 días de edad, afirma que de esta forma los niveles en plasma de Fenilalanina se aproximan a los de los pacientes fenilcetonúricos sin tratar (1,5 mM) (216).

En un estudio comparativo de los modelos de producción de hiperfenilalaninemia citados ultimamente en ratas lactantes se concluyó (217) que en ratas tratadas con MPA más Fen, la reducción en el contenido de DNA cerebral ocurre solo debido a una reducida síntesis, mientras que el tratamiento con PCPA más Fen inhibe la síntesis de DNA cerebral además de producirse un incremento del "turnover" o degradación del DNA cerebelar.

Estos trabajos sugieren pues, que el tratamiento de ratas con PCPA más Fen produciría una inhibición de la proliferación celular del cerebro y/o un incremento de la muerte celular en cerebro y cerebelo, mientras que el tratamiento con α -MPA más Fen inhibiría sólo la proliferación celular del cerebro.

Según este último procedimiento de inducción, se han propuesto numerosos modelos de fenilcetonúria maternal. Así, Clifford y col (155) observan mediante adición a la dieta de 0,5% de α -metil- fenilalanina y 3% de Fen unos niveles en plasma 10-20 veces más elevados que los controles. La concentración de Fen en el cerebro se incrementó aun más que en el cerebro de la madre. Los fetos muestran también una suave disminución en el peso cerebral y corporal.

1.C. Metabolismo del colesterol

1.C.1. Dinamica del colesterol.

El colesterol es el esteroles mayoritario del cuerpo humano, actuando como componente estructural de membranas y de lipoproteinas plasmáticas. Por otro lado, constituye el material de partida para la formación de ácidos biliares y hormonas esteroides.

La importancia del colesterol como componente mayoritario de la membrana plasmática radica en su papel estabilizador que contribuye a la integridad global de la misma, así como al papel regulador de la llamada "fluidez" de membranas.

La comprensión de los mecanismos implicados en la formación, transporte y degradación de este componente vital son, pues, de suma importancia. Para medir los parámetros globales del metabolismo del colesterol, se han utilizado diversas técnicas.

Según Angelin (218) la dinámica del colesterol en la especie humana puede resumirse tal como aparece en la figura 3.

El plasma sanguíneo está considerado como el compartimento central del sistema y la cantidad de colesterol plasmático sería la suma del procedente de la dieta y de la síntesis endógena.

El recambio del colesterol está asegurado mediante dos procesos. El primero supone el intercambio del colesterol libre entre el plasma y todos los tejidos(219,220), el segundo implica una desaparición particulada llevada a cabo por los distintos tipos de lipoproteinas.

El colesterol es transferido también desde el compartimento central hacia el hígado donde se transforma en ácidos biliares, los cuales pasan al intestino de donde, en parte, son eliminados con las heces junto a distintos esteroides.

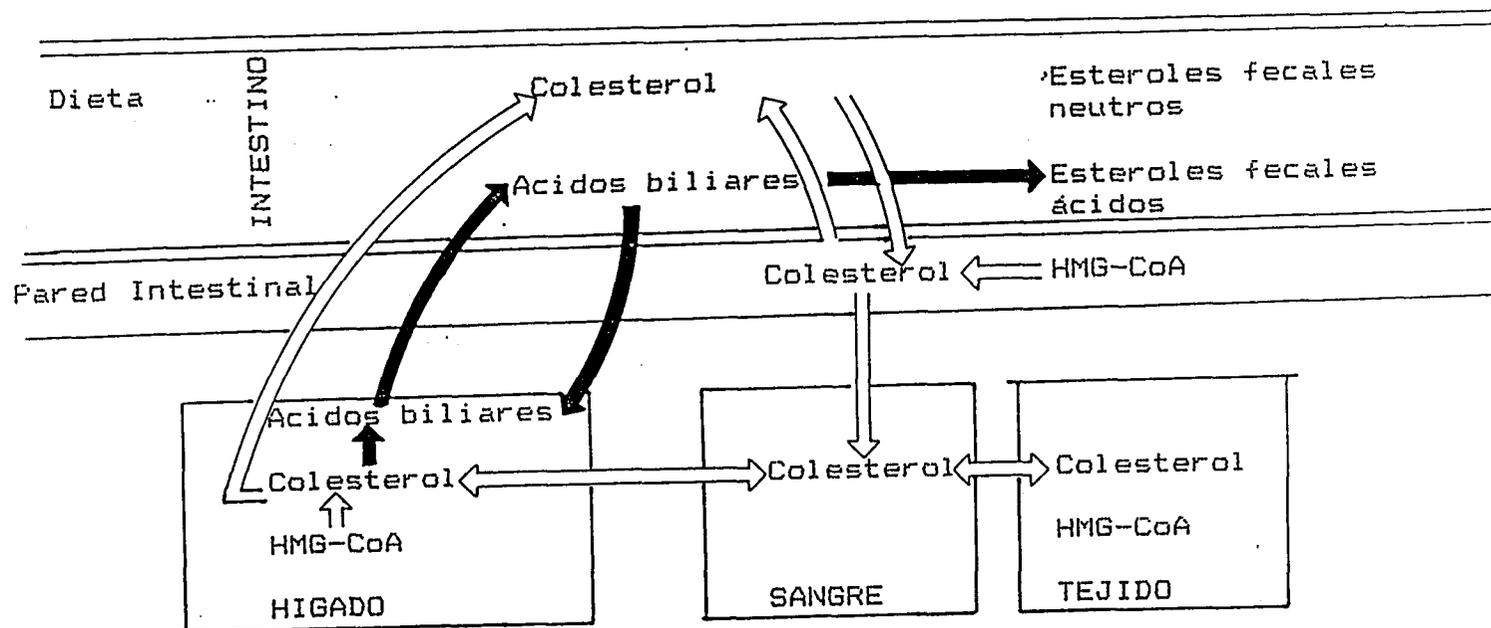


Fig. 3.

Esquema simplificado del metabolismo del colesterol en el hombre.

Según Mathe y Chevallier (221), para poder medir la síntesis, excreción y absorción, se necesita que el individuo haya alcanzado el estado estacionario, es decir, que las concentraciones plasmáticas de colesterol permanezcan constantes y que las entradas totales de compuesto sean iguales a las salidas.

En terminos de Chevallier, la absorción se define como la entrada del colesterol de la dieta al espacio de transferencia. La excreción constituye la transferencia de moléculas de colesterol desde el interior al exterior del espacio de transferencia (por ejemplo por pérdidas en el lumen intestinal o por descamación de epitelios y secreción sebacea)(222). La secreción constituye la síntesis de colesterol llevada a cabo por los distintos tejidos y su transferencia al interior (secreción interna) o al exterior (secreción externa) del espacio de transferencia.

1.C.1.1. Absorción y transporte.

El índice de absorción neta de colesterol puede considerarse como la diferencia entre el colesterol marcado ingerido y el eliminado en las heces.

Tras la ingestión de alimento, no todo el colesterol presente en el contenido gástrico procede del exterior, sino que éste será una mezcla del ingerido más el excretado y el secretado en la saliva y los fluidos gástricos (223). Una vez alcanzado el lumen intestinal, el contenido gástrico recibe un nuevo aporte de colesterol endógeno, esta vez de origen biliar e intestinal. A este nivel el colesterol se presenta fundamentalmente en forma libre, debido a la acción de la colesteroesterasa pancreática (223,224).

En rata (225) y en pollo (226) esta mezcla no es homogénea, los coeficientes de absorción, excreción, secreción e incluso la misma dieta son distintos, absorbiéndose una mayor fracción de colesterol endógeno. La explicación de este hecho, puede radicar en que el colesterol endógeno es secretado sobre todo por la bilis, en la cual se encuentra ya en estado micelar.

El tamaño del "pool" de ácidos biliares tiene un gran efecto sobre la absorción intestinal de colesterol, como lo demuestra el hecho de que por administración de colestiramina (resina capaz de secuestrar ácidos biliares)

o mediante ligamiento del conducto biliar, se inhibe el proceso de absorción; por el contrario, este proceso se aumenta tras una alimentación con taurocolato (227-229).

Parte del colesterol de los quilomicrones es esterificado antes de que las partículas sean secretadas a través de la membrana basal (229,230). Ya en el espacio extracelular, los quilomicrones absorben el colesterol libre y el esterificado (228,231). Se sabe que hay un intercambio entre las células intestinales y el lumen, así como entre células intestinales y espacios extracelulares (228,232). Los ésteres de colesterol formados de esta manera deben ser transportados a todas las células, donde el colesterol en su forma libre, es utilizado como componente estructural. Estos ésteres también son fuente para la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares.

Para el transporte en plasma, los triglicéridos y ésteres del colesterol son empaquetados en partículas lipoproteicas, formando un núcleo hidrofóbico rodeado de una monocapa de fosfolípidos polares. En la capa superficial existe colesterol libre junto a las llamadas apoproteínas (233).

Se puede hablar de transporte exógeno que transporta lípidos de origen dietético y de transporte endógeno que transporta lípidos de origen hepático y de otros tejidos no intestinales (Fig. 4)

La vía exógena comienza en el intestino, donde los lípidos de la dieta se incorporan en partículas lipoproteicas, los llamados quilomicrones, que entran en circulación y ceden los triglicéridos al tejido adiposo (para su almacenamiento) y al músculo (para su oxidación y producción de energía).

Lo que queda del quilomión, enriquecido en ésteres del colesterol (quilomión remanente) lo extraen de la circulación receptores específicos que se encuentran exclusivamente en las células del hígado, penetrando mediante endocitosis y siendo degradado por los lisosomas (234).

La vía endógena comienza cuando el hígado segrega a la sangre una partícula de gran tamaño, la lipoproteína de muy baja densidad VLDL. El núcleo de esta partícula contiene en su mayor parte triglicéridos sintetizados en el hígado, junto con una cantidad menor de ésteres de

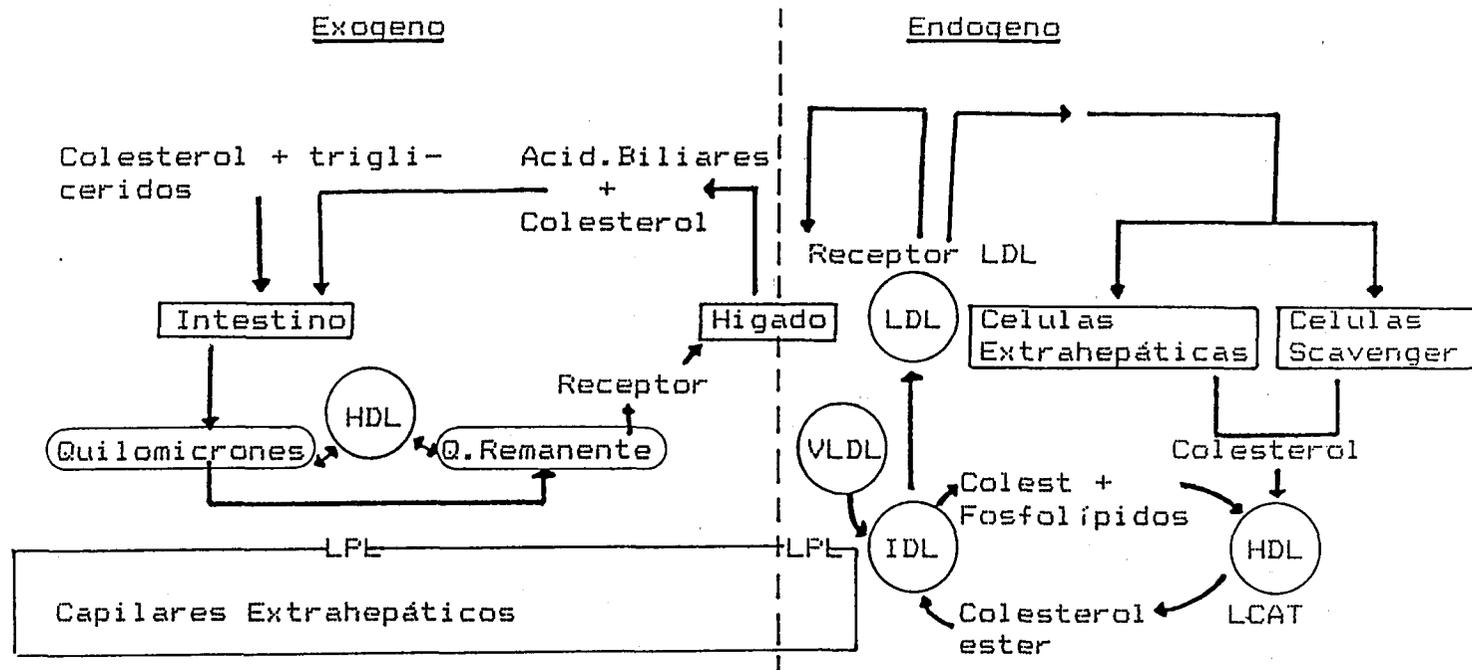


Fig.4.-Modelo de transporte de Lipoproteínas en el hombre.

Ambos ciclos comienzan con la secreción de partículas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) que son convertidas en partículas ricas en ésteres de colesterol (Q. remanente, IDL y LDL) mediante la interacción con LPL. LPL= lipoprotein lipasa; VLDL=lipoproteínas de muy baja densidad; IDL= lipoproteínas de densidad intermedia ; LDL= lipoproteínas de baja densidad; HDL= lipoproteínas de alta densidad; LACAT= lecitín-colesterol aciltransferasa

colesterol. Sobre su superficie se encuentran predominantemente dos proteínas, las apoproteínas B-100 y E, ambas con capacidad de unirse a receptores de LDL (glicoproteína incluida en la membrana plasmática de la mayoría de las células corporales).

Cuando una partícula VLDL llega a los capilares del tejido adiposo o del músculo, se extraen de ella los triglicéridos que transporta, con lo cual, se transforma en un nuevo tipo de partícula de menor tamaño y enriquecida en ésteres de colesterol y que retiene aún las dos apoproteínas. Estas partículas son las llamadas IDL (lipoproteínas de densidad intermedia).

En el hombre alrededor de la mitad de las partículas IDL desaparecen de la circulación con gran rapidez, ya que se unen muy fuertemente a las células hepáticas, que extraen su colesterol para elaborar nuevas VLDL y ácidos biliares. Mahley y Ihneray de California, han demostrado que esa unión tan fuerte se debe a la apoproteína E, cuya afinidad por el receptor de LDL de la célula hepática es mayor que la de la apoproteína B-100.

Las partículas IDL no capturadas por el hígado permanecen en la circulación mucho más tiempo, pasado el cual, la apoproteína E se disocia de ellas, transformándose en lipoproteínas de baja densidad, LDL. Estas últimas se mantienen en el torrente sanguíneo mucho más tiempo, puesto que la afinidad de la apoproteína B-100 por los receptores de LDL es menor (234).

En individuos normales, el colesterol ligado a LDL supone aproximadamente 2/3 del total del colesterol plasmático. Estas LDL transportan el colesterol a las células extrahepáticas así como al hígado, es decir, la función fisiológica normal de las LDL es suministrar colesterol a las células del organismo.

En 1974 Brown y Goldstein hicieron el siguiente descubrimiento (236): Las células captan las LDL gracias a receptores, es decir, a moléculas que se encuentran en la superficie de sus membranas y que reconocen específicamente a la apoproteína B-100 que se encuentra en la superficie de las LDL. Para llegar a este resultado habían añadido unas LDL marcadas con iodo radioactivo a un cultivo de fibroblastos. Las LDL se fijaban en puntos precisos de las membranas celulares donde permanecían a pesar de un lavado intensivo, sugiriendo que estaban fijados a puntos de unión de alta afinidad y eran además

altamente específicos de las LDL. Existen por tanto unos receptores de LDL en la superficie de las membranas celulares, que tienen por función permitir a las células captar LDL.

Estudios bioquímicos posteriores (237) y de microscopía electrónica (238,239) mostraron cómo se produce el proceso de absorción de LDL (Fig. 5). Los receptores que se unen a las LDL se mueven en la superficie de las células hasta regiones deprimidas de la membrana llamadas "hoyos revestidos" que están cubiertos en su interior de un filtro de moléculas proteicas.

Estas regiones se deprimen cada vez más, invaginándose hacia el interior del citoplasma, hasta cerrarse sobre sí mismas formando vesículas que contienen en su interior los receptores unidos a las LDL y emigran hacia el interior de las células. Durante esta migración los receptores se separan de la LDL y vuelven a la superficie para unirse a nuevas LDL empezando de nuevo un ciclo de transferencia.

Por su parte, las vesículas que solo contienen las LDL terminan por encontrar en el citoplasma a los lisosomas con los cuales se fusionan. Los lisosomas contienen una serie de enzimas que permiten degradar totalmente las LDL. Unas proteínas hidrolizan la apoproteína B, liberando sus componentes elementales, los aminoácidos. Unas lipasas ácidas hidrolizan los ésteres de colesterol para dar ácidos grasos, por una parte y colesterol libre por otra. Este último es entonces puesto a disposición de la célula para la síntesis de sus membranas.

Un aspecto importante de esta metabolización celular del colesterol por medio de las LDL es que va acompañado de un sistema de control complejo que permite evitar una acumulación excesiva de colesterol en el interior de las células.

En primer lugar, el colesterol que entra en la célula por esta vía determina la inhibición de su síntesis endógena, inhibiendo la actividad de una enzima clave en la cadena de síntesis de colesterol, la HMG-CoA reductasa. En segundo lugar, el colesterol que entra determina la inhibición de la síntesis de receptores de LDL, lo cual disminuye el nivel de entrada del colesterol aportado por las LDL. Este sistema de control a su vez es tan eficaz que las células no acumulan colesterol en exceso ni

siquiera expuestas a elevadas concentraciones de LDL en sangre (240).

La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad debida a una deficiencia de los receptores de LDL y del gen implicado en la regulación de los mismos. El receptor purificado por Goldstein y Brown es una glicoproteina de PM=160,000. Tambien se ha podido aislar el gen que controla la síntesis del receptor de LDL (241).

En cuanto a las HDL, lipoproteinas de alta densidad, parecen proceder de diferentes tejidos, incluidos hígado e intestino. Además, HDL o precursores de HDL parecen producirse en el plasma durante el proceso lipolítico de los quilomicrones (242). Las HDL estan implicadas en un proceso conocido como transporte reverso del colesterol por el cual adquieren colesterol de los tejidos periféricos y lo transportan directa o indirectamente al hígado para su excreción.

Las HDL son aceptores efectivos del colesterol procedente de las membranas celulares debido a que su capa externa contiene una relación molar colesterol/fosfolípidos inferior a la de la mayoría de las membranas celulares (243).

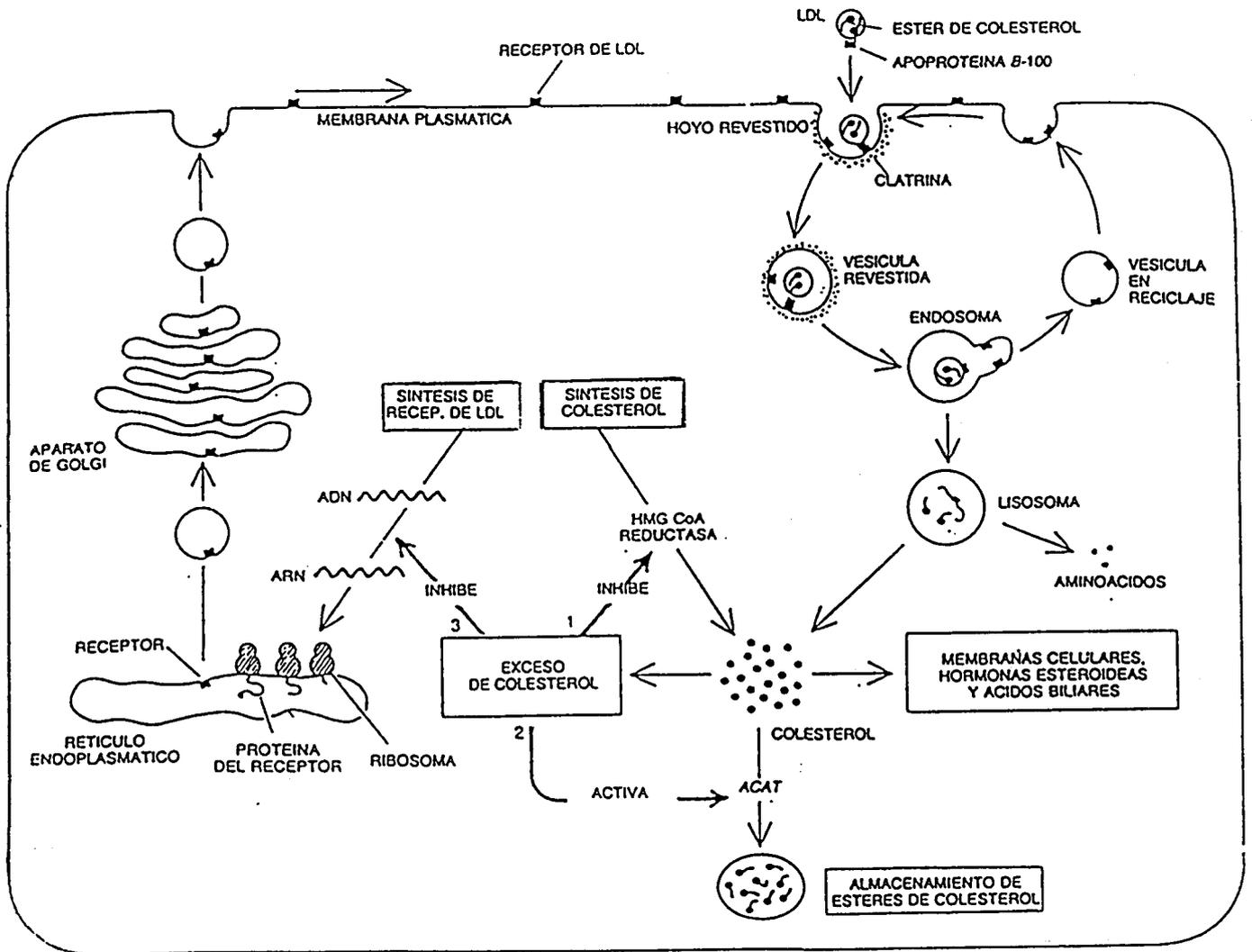


Fig.5-Sistema de captación de LDL

1.C.1.2. Síntesis.

Desde hace bastante tiempo se conocen las velocidades de síntesis y su regulación en los distintos tejidos (244). La importancia de los órganos específicos en la síntesis global de esteroides está basada mayoritariamente en las medidas "in vitro" de la velocidad de incorporación de distintos sustratos marcados a colesterol. El precursor más utilizado ha sido el ^{14}C -acetato, habiéndose evaluado la velocidad de incorporación del mismo a esteroides precipitables con digitonina.

Szere y col. (245) demostraron al contrario de la tesis que anteriormente se había sostenido de que sólo el hígado era capaz de realizar la síntesis, que este precursor era incorporado a esteroides "in vitro" por tejidos diversos como intestino, testículo, riñón, piel y cerebro, así como en hígado.

Popjak y Beekman (246) demostraron casi paralelamente la colesterogénesis extrahepática en animales intactos. Hoy día es notorio que prácticamente la totalidad de los tejidos de mamíferos son capaces, en cierto modo al menos, de sintetizar colesterol "de novo" (247, 248).

No obstante, de estudios llevados a cabo en rata y mono (249, 250) resultó que las mayores velocidades de síntesis de esteroides por unidad de peso de tejido correspondieron a dos órganos: hígado e intestino delgado, y dentro de este al ileón. Las más bajas se registraron en músculo y en S.N.C. de animales adultos.

En cerebro sólo podemos hablar de escasa actividad sintética en el caso del tejido adulto, habiéndose encontrado que en neonatos la situación es la inversa, excediendo en estos casos los valores de los encontrados incluso para el hígado (245) órgano considerado como el principal responsable de la síntesis de esteroides. Todos estos datos nos llevan a considerar el efecto que un déficit en el metabolismo del colesterol puede producir en un cerebro en desarrollo, que nos llevaría sin lugar a dudas a una defectuosa mielinización, con el consiguiente efecto devastador en el desarrollo mental.

La extrapolación de los datos sobre la síntesis obtenidos "in vitro" al animal intacto puede ser polémica, pues hay que tener en cuenta los numerosos problemas teóricos y prácticos inherentes a este tipo de medidas (251).

Algunos autores han indicado que utilizando el 14 C-acetato como precursor pueden surgir numerosos problemas, como una toma deficiente de este precursor por parte de los tejidos, así como la existencia de una dilución desproporcionada de la actividad específica del "pool" intracelular de acetyl-CoA en muchos tejidos, dando lugar a velocidades de síntesis falsas (251). Estudios más recientes llevados a cabo "in vivo" han indicado que la incorporación de agua pesada a esteroides precipitables con digitonina sería un índice fiable de las velocidades absolutas de síntesis de colesterol, dado que penetra rápidamente en la célula, manteniendo una actividad específica constante (251,252).

Turley y col (253) han indicado que los tejidos de la carcasa son responsables de aproximadamente el 26% de la síntesis "in vivo" de esteroides precipitables con digitonina, mientras el hígado e intestino aportan un 50 y 24% respectivamente.

Aunque numerosos estudios concuerdan con el hecho de que el hígado constituye la mayor fuente de colesterol endógeno (225,254), se ha estimado que en rata más de 4 mg. diarios de colesterol sintetizado por el tracto intestinal y secretados al lumen podrían reabsorberse junto con el colesterol de la dieta (225) lo que representa para este animal una tercera parte de la secreción interna total.

Algunos autores han indicado que utilizando el 14 C-acetato como precursor pueden surgir numerosos problemas, como una toma deficiente de este precursor por parte de los tejidos, así como la existencia de una dilución desproporcionada de la actividad específica del "pool" intracelular de acetil-CoA en muchos tejidos, dando lugar a velocidades de síntesis falsas (251). Estudios más recientes llevados a cabo "in vivo" han indicado que la incorporación de agua pesada a esteroides precipitables con digitonina sería un índice fiable de las velocidades absolutas de síntesis de colesterol, dado que penetra rápidamente en la célula, manteniendo una actividad específica constante (251,252).

Turley y col (253) han indicado que los tejidos de la carcasa son responsables de aproximadamente el 26% de la síntesis "in vivo" de esteroides precipitables con digitonina, mientras el hígado e intestino aportan un 50 y 24% respectivamente.

Aunque numerosos estudios concuerdan con el hecho de que el hígado constituye la mayor fuente de colesterol endógeno (225,254), se ha estimado que en rata más de 4 mg. diarios de colesterol sintetizado por el tracto intestinal y secretados al lumen podrían reabsorberse junto con el colesterol de la dieta (225) lo que representa para este animal una tercera parte de la secreción interna total.

1.C.1.3. Transformación y eliminación.

Las salidas mayoritarias del colesterol del espacio de transferencia suponen la eliminación fecal de colesterol y su transformación a ácidos biliares, pudiendo considerarse mínimas las cantidades excretadas a través de la piel (255) ó eliminadas en forma de hormonas esteroidicas en la orina (256).

La cantidad de ácidos biliares sintetizados cada día "de novo" a partir de colesterol no sería suficiente para satisfacer las necesidades de estos para una absorción efectiva de sustancias liposolubles, si no existiera un mecanismo de reciclaje que permita que el "pool" de ácidos biliares, pueda ser reutilizado varias veces cada día.

La eficacia de esta denominada "circulación enterohepática" está relacionada directamente con la eficacia del proceso de reabsorción intestinal (257). Tras su absorción por la mucosa intestinal los ácidos biliares penetran tanto en el sistema venoso porta como en los vasos linfáticos, calculandose que aproximadamente el 99% de la absorción se lleva a cabo por el sistema venoso portal (258).

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

La fístula biliar y la colestiramina incrementan los niveles de excreción de ácidos biliares por encima de los valores controles (253,259,260). Por el contrario la administración de ácidos biliares suprime en el hombre su producción endógena y la ilectomía la incrementa en el hombre (262) y en animales (263)

El mecanismo de este sistema "feedback" no está claro, pudiendo deberse a un conjunto de efectos coordinados a nivel de las enzimas limitantes de las rutas biosintética y degradativa del colesterol, es decir de la HMG-CoA reductasa y la colesterol 7 α hidrolasa (264).

1.C.1.3. Transformación y eliminación.

Las salidas mayoritarias del colesterol del espacio de transferencia suponen la eliminación fecal de colesterol y su transformación a ácidos biliares, pudiendo considerarse mínimas las cantidades excretadas a través de la piel (255) ó eliminadas en forma de hormonas esteroidicas en la orina (256).

La cantidad de ácidos biliares sintetizados cada día "de novo" a partir de colesterol no sería suficiente para satisfacer las necesidades de estos para una absorción efectiva de sustancias liposolubles, si no existiera un mecanismo de reciclaje que permita que el "pool" de ácidos biliares, pueda ser reutilizado varias veces cada día.

La eficacia de esta denominada "circulación enterohepática" está relacionada directamente con la eficacia del proceso de reabsorción intestinal (257). Tras su absorción por la mucosa intestinal los ácidos biliares penetran tanto en el sistema venoso porta como en los vasos linfáticos, calculandose que aproximadamente el 99% de la absorción se lleva a cabo por el sistema venoso portal (258).

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

La fístula biliar y la colestiramina incrementan los niveles de excreción de ácidos biliares por encima de los valores controles (253,259,260). Por el contrario la administración de ácidos biliares suprime en el hombre su producción endógena y la ilectomía la incrementa en el hombre (262) y en animales (263)

El mecanismo de este sistema "feedback" no está claro, pudiendo deberse a un conjunto de efectos coordinados a nivel de las enzimas limitantes de las rutas biosintética y degradativa del colesterol, es decir de la HMG-CoA reductasa y la colesterol 7 α hidrolasa (264).

Dietschy ha sugerido que tanto la formación de colesterol como su degradación podrían estar bajo control directo de la cantidad de colesterol que alcanza el hígado desde el tracto gastrointestinal (257).

El segundo de los sistemas "feedback", el controlado por la cantidad de colesterol absorbido fue demostrado en primer lugar en perros por Abell y col (265) y más tarde en rata (266,267). Este mecanismo parece esencial para prevenir situaciones en que la aportación de colesterol en la dieta es inesperadamente elevada y puede tratarse de un proceso adaptativo para mantener el equilibrio dinámico del colesterol en el cuerpo (268).

Aunque la situación en el hombre es peor conocida, se sabe que la excreción de colesterol es comparable a la de producción de ácidos biliares (269,270,271) y que estos últimos se podrían sintetizar por más de una ruta (272). La conversión de colesterol a ácidos biliares en el hombre, no parece afectarse por cantidades elevadas de colesterol en la dieta (273).

1.C.2. Biosíntesis del colesterol.

Los primeros estudios sobre la biosíntesis del colesterol datan del año 1949 y fueron llevados a cabo por Bloch y col (274). Estos autores implicaron solamente al hígado en este proceso, pero a continuación Szere y col. (245) demostraron una incorporación activa del precursor acetato marcado a esteroides precipitables con digitonina en otros muchos tejidos. Popjak y Beechman (246) confirmaron más tarde que practicamente todos los tejidos de mamíferos son capaces en alguna forma de sintetizar colesterol "de novo". No obstante, las velocidades de síntesis, como se ha señalado en puntos anteriores, determinan que el hígado seguido del intestino serían los lugares dominantes en dicha síntesis (244). En el hombre ha sido estimado en 1-2 g/día la producción "in vivo" de colesterol hepático (275).

La biosíntesis de colesterol ocurre principalmente en los microsomas y en el sobrenadante de 105,000 x g de la fracción de homogenados hepáticos (276). Hay aproximadamente 26 reacciones enzimáticas distintas en la conversión bioquímica de acetato a colesterol, catalizadas por enzimas de localización citosólica y microsomal. Brevemente, puede resumirse del siguiente modo (Fig. 6).

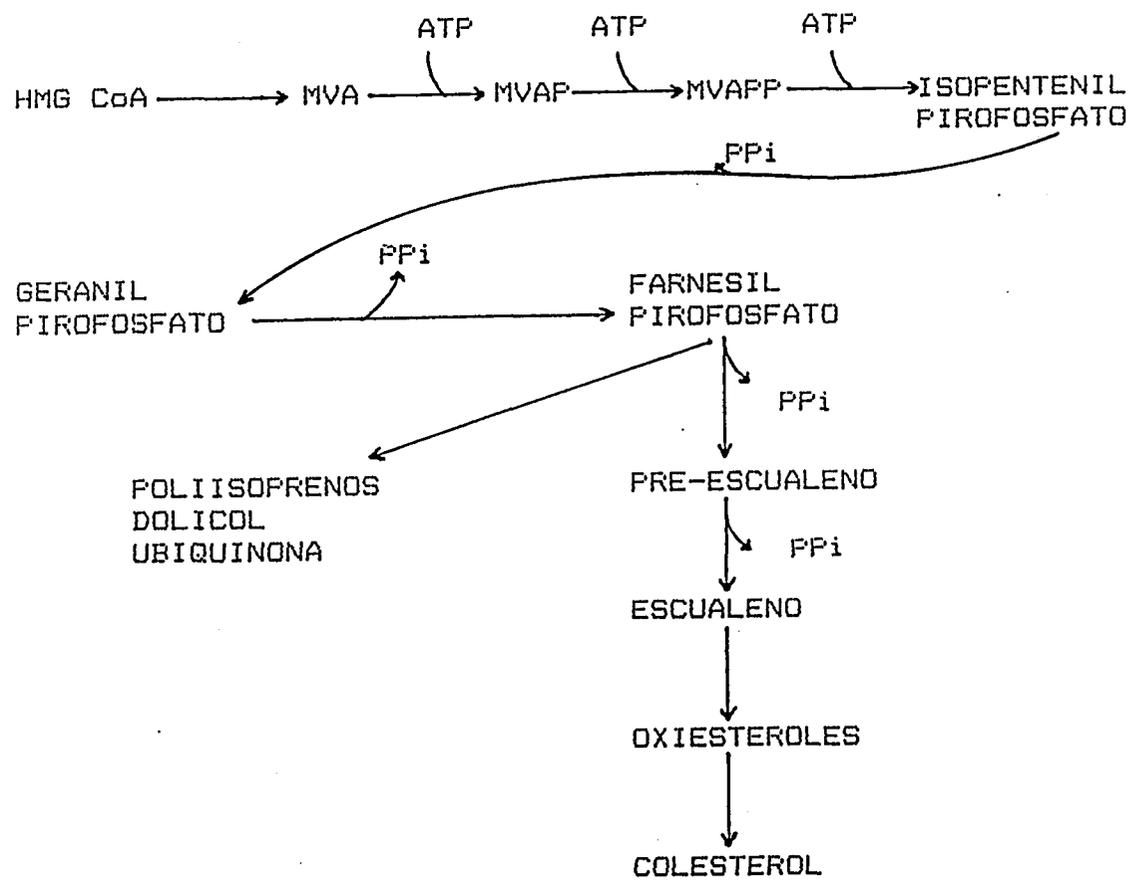


Fig. 6

Esquema simplificado de las distintas etapas en el metabolismo del colesterol

El descubrimiento de la supresión de la síntesis del colesterol bajo determinadas condiciones experimentales, estimuló el interés por identificar los posibles pasos implicados en el control de la biosíntesis de este compuesto.

En este sentido, se apuntó hacia la existencia de un punto mayoritario de control entre el acetil-CoA y el ácido mevalónico, mediado por una enzima de localización microsomal, la HMG-CoA reductasa (277,278). Los cambios observados en los niveles de actividad de la HMG-CoA reductasa en condiciones de ayuno y posterior realimentación (279) se consideran suficientes para explicar esta regulación mayoritaria. El comportamiento en estas mismas circunstancias de las enzimas implicadas en la conversión del ácido mevalónico a colesterol, indicaron así mismo, la existencia de puntos secundarios de control.

Gould y Swyr (280) encontraron descensos en la tasa de conversión del MVA a farnesil pirofosfato y de éste a colesterol. Krishnaiah y col.(281) postularon un sitio secundario de regulación posterior a la formación de escualeno. Los estudios realizados por Wis (282) pusieron de manifiesto una inhibición en determinadas condiciones de la síntesis de colesterol a partir de MVA y escualeno. Takeuchi y col.(283) confirmaron también estos datos.

Puede resumirse pues, que existen al menos tres sitios de regulación de la biosíntesis de colesterol, posteriores a la acción de la HMG-CoA reductasa. Se consideran lugares secundarios de regulación ya que los cambios detectados en estas enzimas no son tan intensos y rápidos como las modificaciones sufridas por la reductasa bajo análogas condiciones (284) (Fig. 7).

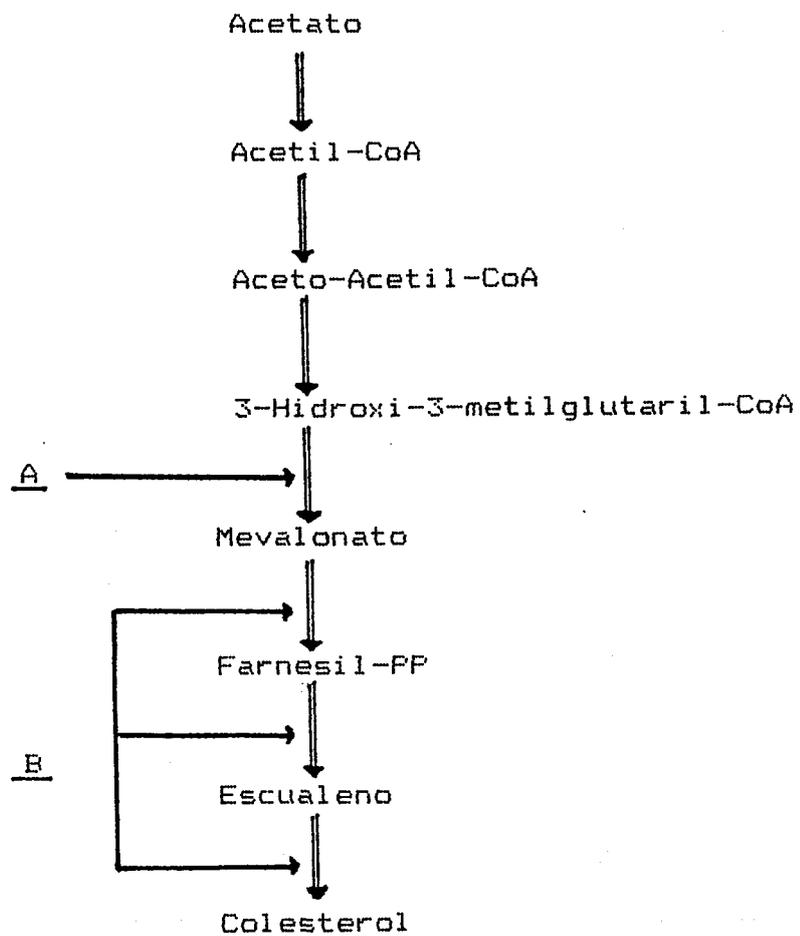


Fig.7

A = sitio primario de regulación "feed back"
B = sitios secundarios de regulación "feed back"

Por otra parte en determinados tejidos (riñón y cerebro) tiene lugar una conversión significativa del mevalonato a ácidos grasos y CO_2 (285) habiendose propuesto una vía alternativa llamada "shunt" del transmetil gluconato para explicar estos fenómenos.

El MVA no solo actúa como precursor para la síntesis de colesterol sino que, en experiencias realizadas con cultivos de células, se ha comprobado su papel en la síntesis de diversos compuestos isoprenoides que, a semejanza del colesterol, son necesarios para el crecimiento celular y a su vez participan en un tipo de regulación "feedback" multivalente de la HMG-CoA reductasa.

El MVA es convertido en tres productos finales : el colesterol, el dolicol y la cadena poliisoprenoide de la ubiquinona (286). Es por tanto necesaria una producción de MVA controlada de forma precisa para asegurar la producción de los distintos productos finales de la vía.

Este control coordinado parece conseguirse gracias a un tipo de regulación "feedback" acumulativo de la HMG-CoA reductasa mediado por el colesterol contenido en las LDL, junto con algún producto final del metabolismo del MVA, que puede ser el mismo ácido mevalónico o bien algún intermediario del "shunt" aunque esta ruta no ha sido puesta de manifiesto en cultivos de células.

Se han indicado diferencias en el metabolismo del MVA en relación con el sexo, siendo las hembras de rata y la mujer las que poseen una mayor actividad vía "shunt" (287,288). También se han apreciado variaciones en la actividad vía "shunt" en relación con la madurez sexual, lo que hace pensar que las hormonas sexuales juegan algún papel en la regulación del metabolismo del MVA (289).

1.C.3. Papel del hígado en el metabolismo del colesterol.

El hígado ocupa una posición central en el metabolismo del colesterol, ya que es uno de los órganos en los cuales la síntesis es más activa, como también posee gran importancia en relación con su conversión en ácidos biliares.

La importancia de la colesterogénesis hepática en la determinación de los niveles de colesterol en suero, se pone de manifiesto por el hecho de que el colesterol sérico está en rápido equilibrio con el "pool" de colesterol hepático.

Estudios "in vitro" de incorporación de acetato a esteroides precipitables con digitonina indican que es el hígado el que produce mayores tasas de incorporación, aunque el ileón también exhibe elevadas tasas de incorporación. En el resto de los tejidos la incorporación es bastante menor, calculándose que el hígado e intestino recogen un 90-97% del acetato marcado.

En estudios "in vivo" el hígado sintetiza un 54% del colesterol total del organismo. En condiciones de ayuno o alimentación con colesterol, la síntesis de colesterol hepática se encuentra inhibida y en estos casos los tejidos extra hepáticos pueden llegar a producir hasta un 70-90% de la síntesis de colesterol total (278).

En pollo, estudios "in vitro" e "in vivo" confirman que el hígado es el órgano más importante de la síntesis de lípidos. La incorporación de MVA y acetato en cortes de hígado de pollo aumenta en los primeros días de vida hasta los 11-15 días en los cuales se estabiliza (291). Tras la eclosión los niveles de síntesis son mínimos debido posiblemente al efecto inhibitorio del colesterol del saco vitelino sobre la colesterogénesis hepática. Tras su reabsorción, se aumentan lógicamente los niveles de síntesis.

Shah (292) encontró resultados parecidos trabajando con ratas lactantes, en las cuales la síntesis de colesterol está inhibida por el colesterol de la leche materna, aumentando la síntesis de este compuesto tras el destete. El cambio dietético producido, además de una mayor necesidad de colesterol para el hígado en formación, pueden ser las causas de este incremento.

Johnson y Shah (293) concuerdan con los resultados anteriores, concluyendo 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 este y colesterol.

Sable-Amplis y Sicart en 1982 estudiaron el efecto de una dieta con colesterol al 0,5% en hígado e intestino de cobaya, encontrando una velocidad mayor de conversión "in vitro" del MVA en hígado que en intestino.

La síntesis hepática de colesterol posee un significativo ritmo diurno (294,295), se aumenta por el stress (294,296), por interrupción de la circulación entero-hepática (294), por alimentación con colestiramina (297,298) y es suprimida por ayuno (280,294,298,299), por una alimentación rica en colesterol (297,298,300) y por alimentación con ácidos biliares (301,302).

La síntesis hepática de colesterol está regulada así mismo por los niveles plasmáticos de las lipoproteínas. Así, ante un descenso del nivel de LDL el hígado responde aumentando la producción de receptores de LDL, así como un incremento en la síntesis de HMG-CoA reductasa para aumentar la propia producción de colesterol (303).

1.C.4. Papel del cerebro en el metabolismo del colesterol.

El colesterol es el esteroles más importante presente en el sistema nervioso de un animal adulto, llegando a constituir hasta un 10% de su peso seco, en contraste con otros órganos donde representa menos del 1% (304).

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 (305).

El colesterol presente en la mielina se encuentra en constante intercambio con el existente en otros compartimentos del sistema nervioso, como lo demuestran estudios realizados en rata en los que se pone de manifiesto que parte de colesterol de la mielina puede ser sustituido por otros esteroides, entre ellos el 7-deshidro colesterol.

Mediante experiencias tanto "in vitro" como "in vivo" se ha demostrado que son las células gliales las responsables de la síntesis de esteroides en cerebro (306) siendo al igual que en otros tejidos, en la fracción microsomal y la soluble donde se realiza dicha síntesis (307).

En contraposición con el cerebro en desarrollo, el cerebro del animal adulto posee una baja tasa de síntesis (308,309). En cambio, durante el desarrollo el tejido cerebral sintetiza activamente colesterol para la constitución y mantenimiento de las vainas de mielina (310).

Mandel y Bieth (311) encontraron una activa síntesis "de novo" reflejada en el aumento de colesterol detectado en cerebro de rata desde recién nacida hasta llegar a adulta. Los precursores del colesterol se detectan así mismo en mayores proporciones en el tejido cerebral inmaduro que en el de animales adultos. Durante el desarrollo del cerebro, en embrión de pollo (312), rata (313,314) y hombre (314) este tejido contiene desmosterol en niveles considerables. En distintas especies animales se ha demostrado igualmente que la proporción desmosterol/colesterol disminuye de forma regular en relación con la maduración cerebral y particularmente con la deposición de mielina (315), siendo el desmosterol prácticamente indetectable en el animal adulto. Este descenso en la concentración de desmosterol está relacionada con el aumento en la actividad desmosterol reductasa detectada al comienzo de la mielinización (316).

Por otro lado, el colesterol está presente en el cerebro adulto casi exclusivamente en forma libre (317) sin embargo en el cerebro en desarrollo se encuentra una pequeña proporción en su forma esterificada. Se detectaron ésteres de colesterol en medula espinal de embrión de pollo, en cerebro de feto humano (318) en cerebro de niños recién nacidos (319) y en ratas durante el proceso de mielinización (307)

Volpe y col (320) postulan que el desmosterol y colesterol esterificado juegan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de colesterol durante el desarrollo, diferenciación y mielinización del sistema nervioso. Estos esteroides se encuentran también presentes en tumores cerebrales en cantidades apreciables, debido al aumento en la síntesis de esteroides en tejidos tumorales.

El cerebro adulto posee el complemento enzimático necesario para la síntesis de esteroides y éste es semejante al del hígado (321) sin embargo existe dificultad en detectar biosíntesis en el cerebro adulto. Hellstrom (322) usando ¹⁴C-acetato como precursor, detectó incorporación de éste a colesterol en cortes de cerebro en

rata adulta. En neonatos, la incorporación de este sustrato a esteroides excede incluso a los valores encontrados para el hígado (323). Kandutsch y Saucier (324) detectaron también una gran incorporación de acetato y MVA marcados radioactivamente a esteroides en ratas recién nacidas. La tasa de incorporación aumenta desde el nacimiento hasta los 11 días de edad para disminuir posteriormente hasta los alcanzar los valores adultos.

Ramsey y col. (307) apuntan la idea de que la administración del precursor mediante inyección intracerebral puede indicar la verdadera capacidad del cerebro para sintetizar colesterol, pues de esta forma se aumenta el nivel del precursor disponible para la biosíntesis del cerebro y se elimina la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica.

La proporción de colesterol biosintetizado en pollo a partir de precursores marcados indica que los esteroides presentes en el sistema nervioso central son mayoritariamente resultado de una síntesis endógena (325). Connor y col (326) tras experiencias en las que se inyectaban precursores marcados a la yema, concluyeron que aunque la mayor parte del colesterol del embrión en desarrollo procede del saco vitelino, el 90% del colesterol cerebral procede de nueva síntesis.

Turley y col. (253) mostraron "in vivo" una velocidad de síntesis elevada en ratas de 14 días, llegando a la conclusión de que aproximadamente el 75% de los esteroides precipitables con digitonina eran resultado de una síntesis endógena.

Tanto en pollo como en otros animales, una dieta rica en colesterol no afecta a los niveles de este compuesto en cerebro (327,328). La resistencia del tejido cerebral a la excesiva deposición de colesterol puede atribuirse al bloqueo ejercido por la barrera hematoencefálica (329) o al lento recambio del colesterol en el animal adulto(330).

El ayuno y la malnutrición poseen un efecto marcado con respecto a la síntesis de colesterol en cerebro. Así, la tasa de deposición de colesterol en cerebro de ratas lactantes es reducida por la malnutrición (331). El ayuno igualmente afecta a la incorporación de precursores marcados inhibiéndola (332).

Con respecto al mecanismo de regulación, Kandutsch y col. (324) han indicado que posiblemente existe una inhibición "feedback" en cerebro de ratones a nivel de la HMG-CoA reductasa, enzima que regula la biosíntesis del colesterol en ratones solo a partir del día 11 después del nacimiento.

Marco y col. (333) indican que la actividad HMG-CoA reductasa de cerebro de pollo presenta variaciones significativas a lo largo del desarrollo embrionario y que los niveles de esta enzima en cerebro son muy superiores a los de los distintos órganos, aunque en los días inmediatos a la eclosión aumenta la actividad reductasa en hígado e intestino.

Estudios de las variaciones en las incorporaciones de MVA en estos animales (334) sugieren que los niveles de actividad de varias enzimas implicadas en la conversión de este precursor a escualeno y colesterol varía coordinadamente durante el periodo de mielinización.

Edmon (335) comparando la actuación del β -hidroxibutarato (BHB), acetoacetato, acetato y MVA, como precursores de lípidos en el sistema nervioso, mostró la utilización preferencial de los cuerpos cetónicos sobre los otros sustratos para la síntesis de lípidos en etapas iniciales del desarrollo de la rata. Efectivamente, mediante estudios tanto "in vitro" como "in vivo" se ha demostrado la preferencia que el cerebro posee sobre otros órganos para utilizar los cuerpos cetónicos y glucosa para la síntesis de ácidos grasos y esteroides, siendo la incorporación mayor desde cuerpos cetónicos que desde glucosa y aun más desde β -hidroxibutarato que desde acetato.

Las enzimas necesarias para la utilización del acetoacetato son activas en cerebro de rata neonatal (336,337) disminuyendo estas actividades con la edad hasta el nivel adulto. Tradicionalmente se ha supuesto que la mayor ruta de utilización de cuerpos cetónicos está localizada en la mitocondria; más tarde se ha postulado la existencia de una ruta extramitocondrial (337,338).

De las experiencias llevadas a cabo por distintos autores, resulta evidente que la utilización de cuerpos cetónicos durante el periodo de lactancia, es preferencial en el periodo de lactancia, siendo usados estos no sólo como fuente de energía sino también de carbono para la síntesis de lípidos (339,340). Estas experiencias

incluyen tambien las realizadas tanto "in vitro" como "in vivo" en el pollo (341).

1.C.5. Principales enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol.

1.E.5.1. HMG-CoA reductasa.

Esta enzima ha sido objeto de amplios estudios ya que se ha puesto repetidas veces en evidencia que es el punto de control principal en la biosíntesis del colesterol (323,432). Tanto es así, que la capacidad colesterogénica de un tejido se ha medido tanto por la velocidad del tejido en la utilización de un determinado precursor del colesterol como por la actividad HMG-CoA reductasa

Han mostrado actividad HMG-CoA reductasa numerosos tejidos de mamíferos, como hígado, intestino y cerebro (343). Así mismo también existe actividad reductasa en cultivo de fibroblastos (344) y linfocitos humanos (345) así como en cultivos de distintas líneas celulares (346).

En hígado de rata la actividad reductasa está localizada en la fracción microsomal y dentro de esta fracción, un 80% de la enzima está asociada con la fracción correspondiente al retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y membrana plasmática (347). Más recientemente se ha señalado que el reparto en la fracción microsomal no es homogéneo, presentándose fundamentalmente en secciones del retículo endoplasmático rugoso con ribosomas de baja densidad (348).

Beg (349) y Tanaka (350) refiriéndose a la purificación y caracterización de la HMG-CoA reductasa de hígado humano apuntan que la enzima es un monómero de PM aproximado de 50,000. "In vivo" parece encontrarse formando un dímero de PM 104,000. Su estructura es parecida a la enzima de rata, ya que es precipitable con anticuerpos extraídos de estos roedores.

Ha quedado establecido que la mayor proporción de actividad HMG-CoA reductasa se encuentra en la fracción microsomal (351), por tanto, esta se presenta acompañada de una serie de membranas y elementos extraños que lógicamente condicionan su actividad. El proceso de solubilización pretende la separación de la enzima de la

membrana y para ello se han utilizado diversas técnicas como la utilización de desoxicolato, procedimiento que resulta poco reproducible (352).

Browns y col. (353) han descrito procedimientos de congelación rápida de los microsomas en nitrógeno líquido. Heller y Gould (354) los congelan lentamente y los liofilizan después, consiguiéndose con estas técnicas una solubilización de un 20 a 30% de actividad reductasa microsomal presente en un principio. El tratamiento con fosfolípasa de preparaciones crudas de veneno de serpiente solubiliza hasta un 90% de actividad, e incubando con ClK 4mM a temperatura ambiente se solubiliza más del 80% (353). Si se combina el tratamiento del ClK con la congelación-descongelación se puede incrementar aun más el rendimiento (353).

Philipp y Shapiro (355) someten a los microsomas a un fuerte choque iónico con 2,6 M incuban a 60°C y realizan centrifugaciones a 105,000 x g a temperatura ambiente, solubilizando de este modo hasta el 90% de la actividad microsomal.

De todos los procesos y métodos descritos por los distintos autores parece desprenderse la idea de que la solubilización puede incrementar la accesibilidad del sustrato a la enzima cuando la estructura de la membrana está total o parcialmente desorganizada. Alternativamente, las moléculas existentes pueden pasar a formas más activas o bien inhibir la actividad reductasa durante la solubilización (356).

Con respecto a los cambios en la actividad a lo largo del desarrollo, Aragón y col (357) observaron en rata un aumento en la actividad de la enzima en cerebro completo desde el nacimiento hasta los diez días, para disminuir posteriormente hasta valores adultos.

Kandustsch y Saucier (324) en sus experiencias sobre actividad reductasa e incorporación de acetato y MVA, concluyeron que la HMG-CoA reductasa regula la tasa de síntesis de esteroides desde acetato enratón solo a partir del 11 día después del nacimiento en adelante.

Maltese y Volpe (358) por el contrario demostraron que la actividad específica de la reductasa disminuye desde el 4º día del nacimiento, mientras que si nos referimos al cerebro completo, esta aumenta como cabría esperar en base al gran incremento en el contenido en

colesterol en cerebro durante este periodo.

Se ha sugerido (358) 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 periodo en que la capacidad de activación de la reductasa es mayor (de 4 a 10 días) se correlaciona bien con el periodo en que la incorporación de acetato a colesterol es más activa en el desarrollo del cerebro de ratón (324).

La elevada síntesis del colesterol en el cerebro en desarrollo en comparación con el adulto se relaciona también con las altas actividades observadas en cerebro de ratas jóvenes en comparación al adulto (359). Esta premisa puede tener 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, estando además 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 de actividad reductasa está muy disminuida con respecto a los controles (324).

De los estudios realizados en periodo perinatal en rata (360,361) se deduce que en la actividad reductasa de hígado fetal existen dos picos de actividad, uno a los cuatro días antes del nacimiento y otro tras el destete, debido a la interrupción de los niveles de colesterol en suero debidos a la leche materna.

En cerebro (360) se observa un pico máximo a los 4 días tras el nacimiento, etapa que coincide con la máxima mielinización, concluyéndose que la actividad enzimática parece estar relacionada con las demandas fisiológicas de cada tejido para la síntesis de colesterol, no existiendo una regulación coordinada.

Mcnamara y col. (361) apuntan a su vez que es improbable que el patrón de reductasa se deba a la concentración de colesterol hepático, sino que es causado fundamentalmente por factores dietarios.

Los estudios realizados en pollo durante el periodo postnatal por Alejandre y col. (362) demuestran que el patrón de desarrollo observado en la reductasa de cerebro, hígado e intestino es distinto. En cerebro la enzima presenta elevados niveles de actividad, pero no varía

apreciablemente durante las dos primeras semanas de vida postnatal. Por su parte la enzima hepática presenta niveles mínimos de actividad a los 4-5 días alcanzando posteriormente niveles superiores a los de cerebro. En intestino también se produce un aumento de actividad hacia los 4 o 5 días, aunque los valores máximos alcanzados en este caso son menores que los de cerebro. En intestino e hígado los cambios se relacionan con las condiciones nutricionales, mientras la enzima de cerebro actúa al igual que en rata independiente de los factores nutricionales.

La HMG-CoA reductasa está sometida a control por una serie de señales fisiológicas que básicamente suministran información sobre la necesidad de nueva síntesis de colesterol. Este control puede resumirse según vemos en la Fig. 8, en dos categorías:

a) una regulación a "largo plazo" de la cantidad de proteína enzimática modificando el equilibrio entre la síntesis y la degradación (parte superior del esquema).

b) una regulación a "corto plazo" de la actividad catalítica de la enzima existente (parte inferior).

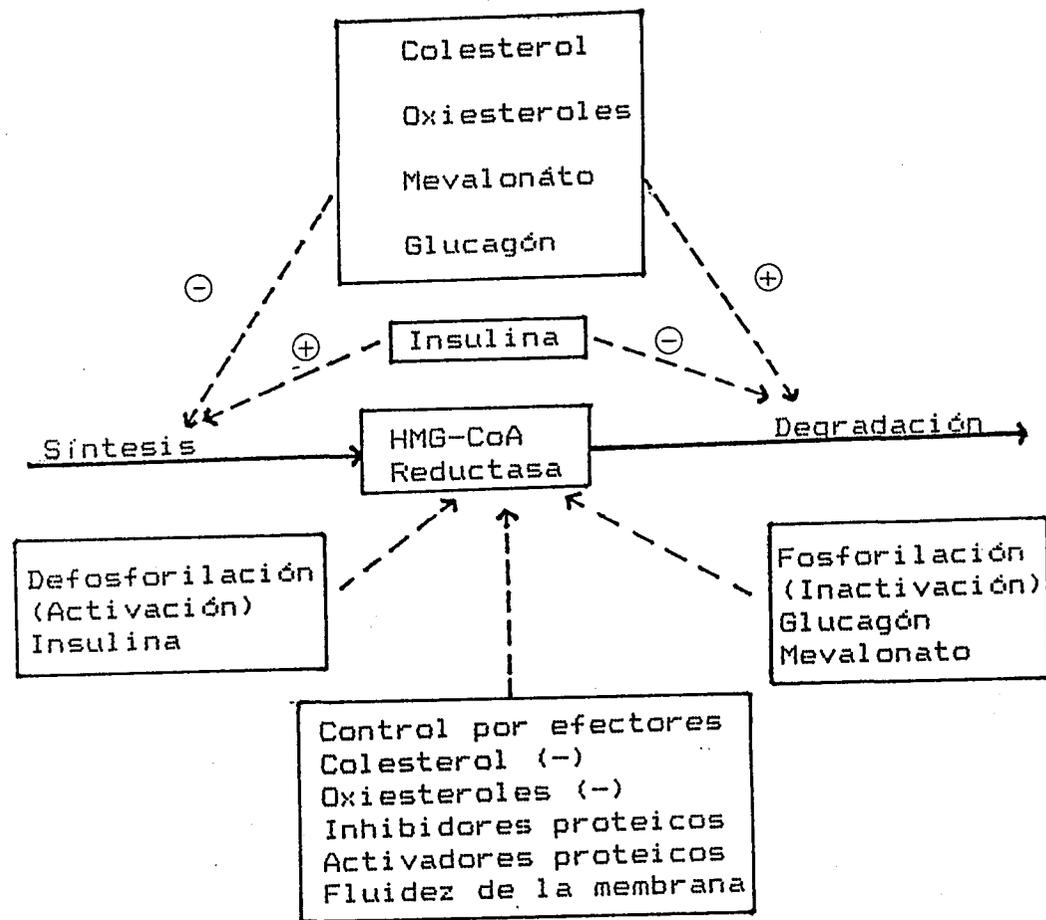


Fig. 8
Control multivectorial de la Reductasa

Modulación covalente

La modulación covalente consiste en un mecanismo de activación-inactivación de la HMG-CoA reductasa consistente en la fosforilación de la enzima que daría lugar a su inactivación, mientras que la defosforilación daría lugar a su activación (Fig. 9).

La primera evidencia de este sistema de regulación fue publicada por Beg y col. en 1973 (363). A partir de entonces numerosos investigadores apoyaron esta hipótesis, aunque recientemente es tema de controversia. Así, Goodwin y Margolis (364), Berndt y Gaumert (365) y Berndt y col (366) apoyaron la idea de la activación por modulación covalente. Shapiro y col (367), Chow y col. (368) y Brown y col. (369) confirmaron este sistema de inactivación dependiente de ATP-Mg.

La actividad enzimática podría restaurarse por incubación con una enzima citoplasmática en presencia de EDTA (370) o bien mediante una fosfoprotein fosfatasa hepática parcialmente purificada (371). Se demostró más tarde la existencia de una HMG-CoA reductasa fosfatasa (372) y una HMG-CoA reductasa cinasa (370) ambas citoplasmáticas, que intervendrían en el proceso de activación-inhibición de la reductasa microsomal. A su vez, estas enzimas citoplasmáticas serían susceptibles de convertirse en formas activas e inactivas por un mecanismo de fosforilación y defosforilación, convirtiéndose el proceso en un modelo sofisticado de biosíntesis de colesterol.

Marcando con ³⁵P el ATP, tendría que incorporarse a la enzima lo que llevaría a una pérdida de actividad. Efectivamente esto se observó, a la vez que la proteína citoplasmática activadora se inhibía por ión fluoruro (inhibidor de las fosfatasas) por lo que se apuntó que la proteína citoplasmática activadora sería una fosfatasa.

En 1979 Beg (373) aísla la proteína inhibidora citoplasmática y la llama reductasa cinasa, purificándola en microsomas y citoplasma. Todas estas experiencias son llevadas a cabo "in vitro" y con enzima solubilizada. Gibson estudia el efecto de la insulina y del glucagón (374), confirmando que la insulina es hipercolesterolémica ya que produce una pérdida de fósforo de la reductasa y de la reductasa cinasa; por el contrario el glucagón

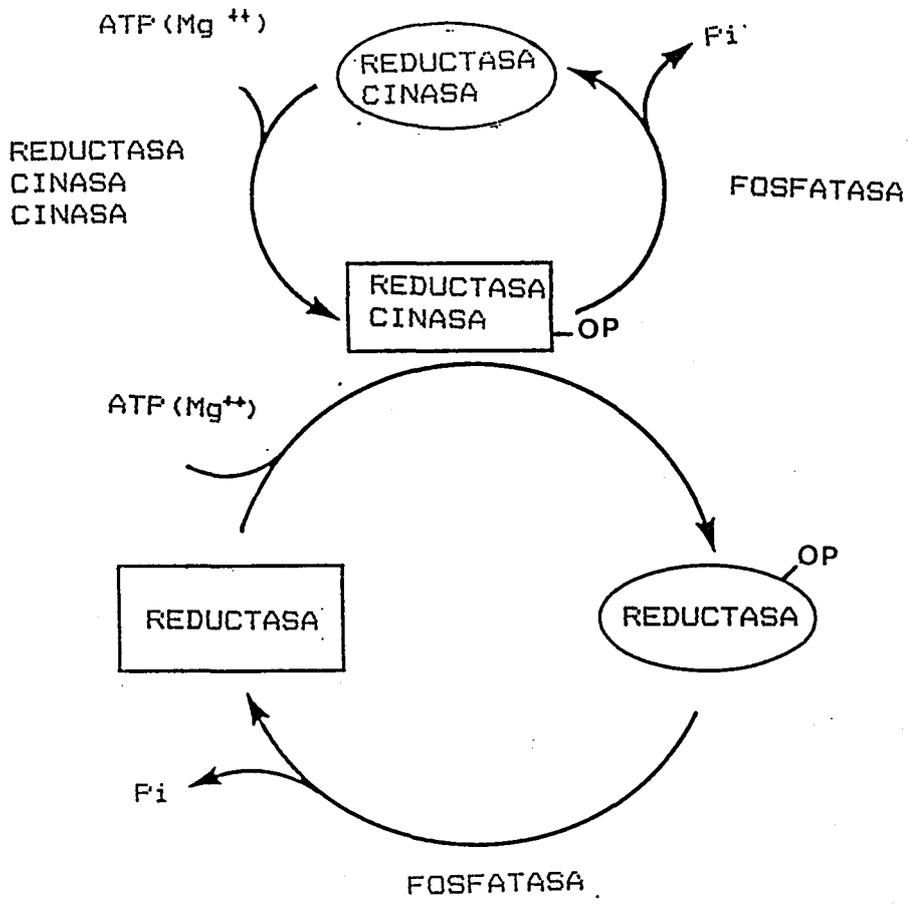


Fig. 2

Sistema biciclico de control de la HMG-CoA reductasa por fosforilación reversible.

fosforila ambas enzimas siendo por tanto hipocolesterolémico.

El sistema reductasa cinasa- reductasa fosfatasa ha sido identificado en hígado de una gran variedad de vertebrados incluyendo al humano (375). Avignan y Beg (376) han demostrado la fosforilación reversible de la reductasa y la reductasa cinasa en extractos de piel humana y más recientemente en hígado humano (377).

Sin embargo Brown y Goldstein (378) estudian "in vivo" la razón entre las formas fosforilada (inactiva) y la defosforilada (activa) en situaciones de stress, dieta con colesterol, colestiramina y en el ritmo. Esta relación según estos autores no varía llegando a la conclusión de que la modulación covalente no existe y apuntando que en estos casos la variación se produce en la síntesis de la enzima.

Otros autores apuntan que el ritmo circadiano es debido a síntesis de enzima y que el mecanismo de modulación covalente existe en estados especiales y en periodos muy cortos y a continuación se inhibe o activa la síntesis.

Regulación a nivel de membrana

El contenido en colesterol de las distintas membranas celulares puede ser variado experimentalmente y esto lleva a cambios en la fluidez de la membrana (379).

Algunos autores (380) consideran que la fluidez de la membrana está relacionada con sus componentes químicos, fundamentalmente con el colesterol o con la relación colesterol/fosfolípidos. El colesterol, debido a su estructura sería el componente que infundiría rigidez a la membrana. Esta hipótesis de modulación de la actividad reductasa por cambios en la fluidez de la membrana es también tema de controversia.

Sabine y James (381) apoyaron la hipótesis a partir de sus trabajos por modificación de la temperatura que afecta lógicamente a la fluidez de los lípidos de la membrana y que se relacionaron con cambios en la actividad HMG-CoA reductasa.

Mitropoulos y col. (382) 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, lo cual produciría cambios inmediatos en su actividad y propiedades. Esto podría provocar también cambios en la concentración de la enzima debidos a alteraciones en la síntesis enzimática o a cambios en la tasa de asociación de la enzima a la membrana alterada por la concentración de colesterol libre.

Alejandro y col. (383) encuentra en pollo tras la suplementación de la dieta desde el nacimiento con colesterol, un aumento en la relación molar colesterol/fosfolípidos en microsomas que se relaciona con la disminución de actividad HMG-CoA reductasa observada en el mismo tratamiento. Así mismo, se ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre una dieta "choque" rica en colesterol y la inhibición de la reductasa producida por los cambios en la relación molar colesterol/ fosfolípidos observados ya a las 7 h. de tratamiento (384).

Sin embargo, otros autores (385) no correlacionan estos hechos. Así Baquir y Booth (386) no implican el aumento de esteroides en los microsomas con una disminución de actividad reductasa.

Modulación por distintos efectores

La HMG-CoA reductasa es controlada por el estado nutricional y hormonal de los animales (343,344).

La administración de colesterol a animales intactos (362,386,387), fibroblastos (361) o hepatocitos aislados de rata (388), produce una inhibición de la actividad reductasa y de la incorporación de acetato a esteroides. El colesterol actúa pues como regulador de la actividad HMG-CoA reductasa a través de un mecanismo "feedback".

La regulación de la HMG-CoA reductasa es un mecanismo homeostático para mantener constante el contenido celular de esteroides (389,390), por lo que un aumento en la concentración intracelular de colesterol llevaría consigo una disminución de actividad enzimática.

Efetivamente la actividad HMG-CoA reductasa se afecta por los esteroides sintetizados endógenamente tanto "in vitro" como "in vivo" (391). La disminución de la actividad reductasa puede deberse a la inactivación de la enzima preformada (389). Sin embargo algunos autores no han podido demostrar un efecto directo del colesterol sobre la HMG-CoA reductasa en preparaciones enzimáticas (342,387).

Actualmente el tema está centrado en la regulación de la actividad reductasa por lipoproteínas, fundamentalmente en fibroblastos y cultivos de distintos tipos celulares. Cuando en los cultivos celulares existen LDL presentes en el medio (392,393) las células en cultivo expresan baja actividad reductasa por supresión aparente de síntesis de moléculas enzimáticas (394). Si en el medio de cultivo se han eliminado las LDL se produce un aumento de HMG-CoA reductasa que vuelve a suprimirse hasta en un 98% si de nuevo se incorporan LDL al medio (393,395,396).

Se ha sugerido que las células requieren dos productos derivados del MVA para suprimir la actividad reductasa. Uno, el colesterol que es necesario a niveles muy elevados y se abastece bien por medio de LDL o bien colesterol sintetizado endógenamente desde MVA (389,390). El otro producto, necesario en menor cantidad puede ser el MVA o algún producto de su metabolismo (397).

Cuando las LDL están ausentes del medio de cultivo, la mayor parte del MVA es incorporado a colesterol (397), si estas están presentes la reductasa se inhibe parcialmente y el MVA formado se desvía a compuestos no esteroidicos fundamentalmente ubiquinona (395). La adición pues de LDL suprime actividades de enzimas distales a la formación de MVA, como escualeno sintetasa (398), aunque de forma mucho menos rápida que en el caso de la reductasa (394,398). Estos mecanismos de desviación del MVA a la ruta no esteroidica y los de la supresión de la reductasa parecen ser coordinados (395).

Brown y Goldstein (397) proponen un mecanismo de regulación "feedback" multivalente para la HMG-CoA reductasa, existiendo un punto primario de acción del colesterol derivado de LDL a nivel de HMG-CoA reductasa y un lugar secundario de acción del colesterol-LDL a nivel de la conversión del farnesil pirofosfato a escualeno. El farnesil, el dolicol y la ubiquinona podrían actuar como reguladores no esteroidicos de la HMG-CoA reductasa.

Estudiando el efecto de las hormonas sobre la actividad HMG-CoA reductasa hepática, se ha observado que la insulina tiene un efecto hipercolesterolémico. Después de inyectar insulina a ratas normales se elevan tanto la actividad reductasa como la síntesis de colesterol (399). Sin embargo, las ratas diabéticas poseen actividad reductasa muy baja, observándose que la estimulación de reductasa por medio de insulina se bloquea parcialmente por glucagón. Al parecer, el glucagón actúa limitando el incremento de actividad reductasa iniciado por otras hormonas (400).

Entre las hormonas del tiroides, la triyodo tironina estimula la actividad reductasa, siendo necesarias 3 o 4 horas para que se noten sus efectos y persistiendo estos 32 horas más (401).

Por otro lado, la noradrenalina inhibe la secreción de colesterol y lipoproteínas, aumentando la actividad reductasa. En lo que se refiere a hormonas sexuales, los andrógenos, la progesterona y los estrógenos pueden suprimir la actividad reductasa cuando se añaden al medio de cultivo de fibroblastos humanos (402), o bien cuando son ingeridos o inyectados en rat y mono (403,404).

En resumen se puede concluir que la información existente con respecto a la regulación hormonal no ofrece una explicación adecuada.

1.C.5.2. Mevalonato cinasa.

La conversión del mevalónico a isopentenil pirofosfato (Ip-PP) se produce mediante tres reacciones. Las dos primeras, dos fosforilaciones que suponen la conversión del MVA a ácido fosfomevalónico (PMVA) y de este a ácido pirofosfomevalónico (PPMVA), están catalizadas respectivamente por las enzimas MVA cinasa y PMVA cinasa. La tercera reacción catalizada por la enzima PPMVA descarboxilasa consiste en una deshidratación y descarboxilación dependiente de ATP en la que el PPMVA es convertido en isopentenil pirofosfato.

En el año 1960 Levy y Popjak (405) indicaron la formación de PMVA y PPMVA a partir de MVA y ATP en hígado de cerdo. La mevalonato cinasa de este origen fue purificada unas cien veces, demostrando ser una enzima con grupos sulfhidrilos en su centro activo, que requiere ATP

de forma específica como nucleótido. La concentración óptima de ATP dependía a su vez de la concentración de iones Mg^{+2} presentes en el medio de incubación.

La enzima de hígado de cerdo purificada también por Dorsey y Porter en 1968 (406) era inhibida de forma selectiva por los ésteres fosfóricos geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato. La fosforilación del MVA catalizada por la enzima purificada de hígado de cerdo parece ser un proceso secuencial donde todos los sustratos tienen que reaccionar con la enzima antes de que el producto sea separado (407).

En hígado de rata, Slakey y col (279) han indicado que tanto la mevalonato cinasa como la fosfomevalonato cinasa no sufren variación en condiciones de ayuno ni existe ritmo circadiano en la actividad de dichas enzimas.

Ramachandran y Shah (408) han puesto de manifiesto que tanto la mevalonato cinasa como la fosfomevalonato cinasa muestran un requerimiento específico de ATP así como la presencia de iones Mg^{+2} para su actividad óptima. No observaron variaciones a lo largo de la edad en la actividad de ambas enzimas, aunque los valores de la K_m de la mevalonato cinasa se fue incrementando ligeramente desde el segundo día de vida hasta el 53.

En pollo, la enzima cerebral se localiza fundamentalmente en la fracción soluble obtenida tras centrifugación a $105,000 \times g$ obteniendo un valor aproximado de K_m de $255 \mu M$ (409). La enzima hepática sufre un incremento pronunciado de su actividad tal y como ocurre en otras enzimas lipogénicas (410); por el contrario la enzima cerebral mantiene una actividad constante a lo largo del desarrollo postnatal (411).

Ramachandran y Shah (412) investigando la actividad enzimática en ratas lactantes y posteriormente destetadas no encontraron variaciones en la actividad de la enzima hepática, ni tampoco al suministrar una dieta suplementada con colesterol al 1%. Jabalquinto y Cardemil (413) por el contrario sí han descrito un descenso significativo en las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa en hígado de rata alimentadas con colesterol al 2%, así como en ratas ayunadas o hechas diabéticas.

Gonzalez Pacanowska y col. (411) sí observan disminución de la actividad mevalonato cinasa hepática de pollo en condiciones de ayuno y suplementación de

colesterol a la dieta, así como un incremento de actividad en caso de suplementación de colestiramina.

García-Martínez y col. (414) purificaron parcialmente la mevalonato cinasa hepática de pollo recién nacido encontrando unos valores de K_m de 0,01 mM para el ácido mevalónico y 0,25 mM para el ATP. Esta enzima parcialmente purificada muestra una especificidad absoluta para el ATP. El Mn^{2+} a bajas concentraciones (0,1-1,0 mM) resulta ser mejor activador que el Mg, mientras que a mayores concentraciones el Mn produce una clara inhibición de la mevalonato cinasa. Así mismo la adición de EDTA con o sin iones metálicos, inhibe claramente la reacción enzimática.

En fibroblastos, una alimentación con colesterol al 1% supuso una inhibición de las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa hepáticas, aunque el efecto del colesterol "in vivo" no pudo apreciarse (415).

Con respecto a la modulación, se ha puesto de manifiesto el papel inhibitorio de las LDL. Efectivamente en cultivos de células ováricas de hamster, la eliminación de lípidos del medio de cultivo origina un incremento significativo de actividad. Este incremento era impedido mediante la adición de LDL o 23-Hidroxi-colesterol al medio (416).

Mitchell y Avignán (415) obtuvieron resultados semejantes trabajando con cultivos de fibroblastos de piel humana en los cuales se observaba un incremento de actividad mevalonato cinasa tras la adición al medio de un suero desprovisto de lípidos. Así mismo la adición de demecolcina, una droga que interfiere el ligamiento celular de las LDL, causó también un aumento de actividad de la mencionada enzima.

A partir de todos estos datos se ha propuesto que determinadas enzimas, además de HMG-CoA reductasa pueden tener un papel en la regulación fisiológica de la síntesis de esteroides.

En condiciones de hiperfenilalaninemia inducida a embriones de pollo durante el periodo de mielinización, la actividad mevalonato cinasa tanto de hígado como de cerebro no mostró diferencias con respecto a los controles (109)

1.E.5.3. Fosfomevalonato cinasa.

La caracterización de la fosfomevalonato cinasa fue llevada a cabo por Henning y col. en autolisados de levaduras (417). La enzima purificada demostró que la reacción en presencia de un exceso de ADP era reversible. Esta reversibilidad fue puesta de manifiesto por Helling y Popjak (418) utilizando enzima de hígado de cerdo. Esta enzima en presencia de iones Mg^{2+} exhibía un pH óptimo de actuación de 7,3.

Slakey y col (419) pusieron de manifiesto la formación de PPMVA a partir de MVA, la cual se incrementaba por adición de FK, un inhibidor de las fosfatasa.

En rata se ha observado un aumento de aproximadamente 50% en la actividad de la enzima hepática en ratas destetadas con respecto a las lactantes (412). La actividad cerebral sin embargo no mostró cambios significativos a lo largo del desarrollo.

Bhat y Ramasarma (108) como ya hemos indicado anteriormente, pusieron de manifiesto que en ciertas condiciones de preincubación se producía una inhibición de la actividad enzimática de hígado de rata por ciertos compuestos fenólicos y fenílicos. Los ácidos ferúlico, isoferúlico, p-cumárico y m-cumárico inhibían competitivamente a la enzima.

Los resultados obtenidos en pollo, indicaron una ausencia de variación a lo largo del desarrollo postnatal en la enzima hepática (410). En cerebro y en riñón la enzima tampoco parece presentar variaciones a lo largo del desarrollo (420). Sin embargo estudios posteriores llevados a cabo por Gonzalez Pacanowska y col. (411) han puesto de manifiesto que así como la PMVA cinasa de cerebro mantiene su actividad constante a lo largo del desarrollo postnatal, la PMVA cinasa obtenida de hígado duplica su actividad durante las dos primeras semanas de vida.

Estos mismos autores han mostrado que la suplementación con colestiramina al 3% desde la eclosión origina un incremento de la actividad en hígado (411). Así mismo la suplementación de 5% de colesterol a una dieta estandar origina en hígado una disminución suave de las enzimas fosforilantes del mevalónico aunque de forma menos intensa que en el caso de la enzima pirofosfo

mevalonato descarboxilasa (421).

1.C.5.4. Pirofosfomevalonato descarboxilasa.

La descarboxilación del ácido 5-pirofosfomevalónico para dar lugar a la formación de isopentenil pirofosfato ha sido puesta de manifiesto en diversos orígenes tales como bacterias por Suzue y col., levaduras por Lynen y plantas por Chesterton, así como en animales superiores.

Ramachandran y Shah (412) trabajando con [1-¹⁴C] MVA mostraron un descenso progresivo en la actividad descarboxilasa a lo largo del periodo de lactancia en hígado de rata seguido de un aumento en la actividad tras el destete. Este cambio era extremadamente parecido al patrón obtenido en la incorporación de MVA a lípidos insaponificables (422). La alimentación tras el destete con una dieta suplementada con colesterol al 1% impide el aumento esperado en la actividad.

Estos resultados parecían sugerir que la descarboxilación del ácido mevalónico constituía un paso limitante tanto en animales lactantes como en destetados y que los niveles bajos de actividad descarboxilasa hepática en ratas lactantes estarían asociados al colesterol contenido en la leche materna. Esta fue la primera sugerencia del papel que juega la pirofosfomevalonato descarboxilasa en la regulación de la biosíntesis de esteroides.

Slakey y col. (279) informaron de la susceptibilidad de la descarboxilasa hepática al ayuno indicando que la realimentación restaura la actividad obteniéndose valores superiores incluso 2 ó 3 veces los iniciales. Durr (423) también estudia el efecto del ayuno sobre la actividad enzimática de hígado, yeyuno y tejido adiposo, observando una reducción en la cantidad de CO₂ desprendido.

Los estudios de Bhat y Ramasarma (108) muestran, como ya hemos indicado anteriormente, que determinados compuestos fenólicos y fenílicos podían ejercer una inhibición sobre esta actividad enzimática. La presencia de la estructura fenil-vinilo parece ser fundamental para esta inhibición. Los ácidos p-cumárico, isoferúlico y ferúlico ejercían una significativa inhibición sobre la descarboxilasa. También poseían efecto inhibitorio la fenilalanina, el fenil-láctico y el fenilpirúvico. La

inhibición dependiendo del compuesto podía ser competitiva o no competitiva.

Estos autores indicaron la existencia de un ritmo diurno en la utilización de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA para la biosíntesis del colesterol y en la liberación de CO_2 a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ MVA (424). Realizando medidas directas de la actividad descarboxilasa obtuvieron diferencias significativas entre las doce de la mañana y las doce de la noche. En contraposición Slakey y col. (279) tras realizar medidas directas de la actividad descarboxilasa hepática concluyeron que no existen variaciones en relación con la hora del día. Jabalquinto y Cardemil apoyan también estas afirmaciones (425) negando la existencia de un ritmo circadiano. Mas tarde Gonzalez Pacanowska tampoco encuentra ritmo circadiano trabajando con pollo (411).

Los niveles hepáticos de actividad disminuyen tras suministrar a ratas una dieta con colesterol al 2%, someterlas a ayuno durante 48 h. o inducirles una diabetes experimental (413). La alimentación con una dieta con colestiramina al 3% incrementa la actividad. Estos resultados junto a los encontrados por otros autores parecen indicar la existencia de variaciones coordinadas en la actividad de diversas enzimas implicadas en la conversión de acetyl-CoA a escualeno.

Con respecto al sexo se han indicado diferencias (413) siendo mayor la actividad hepática en hembras.

La purificación parcial de la PPMVA descarboxilasa se ha llevado a cabo en latex de *Hevea brasiliensis*, hígado de cerdo e hígado de rata esta última bastante inestable (426). En hígado de pollo se ha purificado esta enzima obteniéndose una forma altamente purificada y muy estable (427). La enzima aparece como un dímero de $\text{PM}=85,400$ que no requiere la presencia de protectores $-\text{SH}$ para su actividad o estabilidad. Sin embargo es imprescindible para una actividad efectiva la presencia específica de ATP así como de iones Mg^{2+} . El pH óptimo se encuentra entre 4 y 6,5. Los valores de K_m fueron 0,0141 mM para el PPMVA y 0,504 mM para el ATP.

Gonzalez Pacanowska y col. (411) han indicado que la PPMVA descarboxilasa de hígado de pollo aumenta en diez veces su actividad durante las dos primeras semanas de vida. En cerebro la actividad PPMVA descarboxilasa permanece prácticamente constante a lo largo del desarrollo postnatal.

Con respecto al desarrollo embrionario del pollo, Marco y col. (234) han señalado que la PPMVA descarboxilasa muestra un aumento acusado en sus niveles de actividad entre los días 13 y 18 de incubación, disminuyendo posteriormente. Este aumento, que se corresponde con los niveles de colesterol libre en el cerebro, sugiere que la descarboxilación del PPMVA juega en cerebro de embrión de pollo un papel regulador en la conversión de MVA a colesterol

La regulación de la actividad por parte de las LDL (493) ha sido apuntada también ya que en cultivos de fibroblastos de piel humana, la sustitución del suero completo por otro desprovisto de lípidos origina un aumento de la actividad enzimática. Las LDL parecen actuar inhibiendo la PPMVA descarboxilasa aunque en menor medida que la HMG-CoA reductasa.

Por último hemos de reseñar que en condiciones de hiperfenilalaninemia inducida a embriones de pollo (109) en el periodo de mielinización mientras las actividades HMG-CoA reductasa, MVA cinasa y PMVA cinasa, no muestran variaciones significativas con respecto a los controles, la PPMVA descarboxilasa de cerebro muestra una significativa inhibición con respecto a los controles. Las experiencias llevadas a cabo en hígado en las anteriores condiciones no muestran variación en ninguna de las enzimas mencionadas anteriormente.

PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con los antecedentes bibliograficos expuestos y con los trabajos desarrollados previamente en nuestro Departamento, el objetivo principal de la presente Memoria ha sido un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la hipomielinización que acompaña a la hiperfenilalaninemia.

Hemos abordado el estudio mediante experiencias "in vitro" e "in vivo" y nos hemos centrado en las etapas de la biosíntesis del colesterol correspondientes a la síntesis, fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico, por su importancia en la regulación de este proceso.

Los objetivos detallados se expresan a continuación:

1º) Estudio "in vitro" del efecto de la fenilalanina y sus metabolitos sobre las actividades enzimáticas MVA cinasa, PMVA cinasa y PPMVA descarboxilasa de hígado y cerebro de pollo, en experiencias llevadas a cabo con o sin preincubación y a diferentes concentraciones de inhibidor.

2º) Observación del efecto de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos a concentraciones más fisiológicas sobre las actividades PPMVA descarboxilasa y HMG-CoA reductasa de hígado y cerebro.

3º) Obtención de un modelo de hiperfenilalaninemia experimental en pollos y estudio de las actividades PPMVA descarboxilasa y HMG-CoA reductasa en hígado y cerebro de dichos animales.

MATERIAL Y METODOS

3.-MATERIAL Y METODOS

3.A.-Material

3.A.1.-Material Biologico

Se han utilizado pollos machos de la raza Leghorn blanca (Gallus domesticus) que fueron alimentados "ad libitum" con dieta comercial estándar o con dieta especial segun los casos.

Las experiencias descritas se realizaron durante el periodo postnatal a los 9 y 14 dias de edad tras la eclosión.

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

Los pollos fueron suministrados por la empresa Avigrana S.A. el mismo dia de su nacimiento y durante la ultima temporada por la granja "Los Arcángeles" de Alcalá de Henares.

Fueron instalados en una habitación termostatzada alojándose en jaulas que contenian aproximadamente 25 pollos cada una. La temperatura se mantuvo constante entre 28 y 30 °C asi como el ciclo de iluminación producido mediante tubos fluorescentes cuyo funcionamiento estaba controlado por un temporizador electrónico que provocaba un periodo luminoso durante las 9 a.m. hasta las 9 p.m. La renovación de aire se mantuvo gracias a la instalación de un ventilador de turbina.

Los animales fueron alimentados con una dieta estándar, marca Sander, tipo A00, cuya composición centesimal fue la siguiente:

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

Total 100

La dieta especial suministrada en determinados casos fue la estandar suplementada con L-fenilalanina (Fluka Garantie) al 5% y α -metil fenilalanina (Fluka Garantie) al 0,4% como inhibidor de la fenilalanina hidroxilasa. La dieta sólida así preparada fue mezclada hasta presentar un aspecto homogéneo y suministrada a los animales "ad libitum".

En el caso de la dieta líquida se preparó añadiendo al agua de bebida fenilalanina en un porcentaje de 10% y α -metil - fenilalanina al 0,8%. Se procedió a la solubilización de las citadas sustancias y se les suministró como única fuente de bebida.

3.A.3.-Aparatos e Instrumentación.

Las pesadas tanto de reactivos como de material biológico se realizaron en balanzas Sartorius ($P_{max}=160$ g. $d=0,1$ g.) y Mettler H20T ($P_{max}=160$ g. $d=0,01$ g.)

Para la medida del pH se utilizaron pHmetros Bekman Expandomatic SS-2 ($pH \pm 0,5$) y Radiometer pH M 84 ($pH \pm 0,001$).

La homogenización tisular se llevó a cabo en un "Potter" mecánico (MSE) provisto de un pistilo recubierto de teflón y tubo de vidrio.

Las centrifugaciones para la obtención del extracto enzimático se realizaron en una centrifuga Bekman J 21 B y posteriormente en una ultracentrifuga Bekman modelo LS-50.

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrifuga de mesa "piccolo" (Martin Christ).

La sedimentación de proteínas requerida durante el ensayo enzimático de la HMG-CoA-reductasa se realizó en una microfuga tipo B, Bekman.

Se utilizaron micropipetas "Emil Works" de enrase automático por estrangulamiento (auto cero high precisión) y micropipetas automáticas tipo Finnpiquette y tipo Pipetman (Gilson).

Las incubaciones se realizaron en baños termostizados Tecam tempunit (precisión $\pm 0,1^{\circ}C$) y en baños con termorreguladores portátiles "Selecta". Para las incubaciones con agitación se emplearon incubadores

Solución patrón de aminoácidos preparada a partir de patrón type F-AN y patrón type F-B.

3.A.4.2.-Productos Radioactivos

Los productos radioactivos han sido suministrados por "The Radiochemical Centre" Amersham, Inglaterra a través de Nuclear Ibérica.

Como sustrato de la reacción enzimática HMG-CoA reductasa se utilizó 3-Hidroxi- metil [3-¹⁴C] glutaril-Coenzima A, y como estandar interno DL[2-³H] mevalolactona. Para cuantificar la recuperación en capa fina, se requirió ácido DL[2-¹⁴C]mevalónico. La solución de ácido mevalónico se ha preparado utilizando la lactona de (R-S) [1-¹⁴C]MVA.

Para obtener la sal potásica, se calienta a 50°C la solución bencénica en la que viene el producto tras haber añadido una cantidad determinada de MVA lactona sin marcar a fin de obtener la concentración final deseada. Esta operación se realiza hasta la evaporación total del disolvente y una vez seco, se trata con una disolución de KOH que contenga, en un volumen adecuado, KOH en exceso respecto al número de equivalentes ácidos existentes. El pH resultante es de aprox. 10. Dicha solución se mantiene a 37°C durante 30 minutos para romper el anillo lactónico, finalizados los cuales se guarda hasta su utilización a 4°C. Antes de usarlo de nuevo se mantiene a 37°C durante otros 30 minutos.

El [1-¹⁴C]MVA preparado según este procedimiento presenta una actividad específica de 0,92 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ (2044 dpm/nmol).

3.A.4.3.-Otros reactivos

Se han utilizado HMG-CoA no marcado, G6P (Glucosa 6 fosfato), EDTA y DTT procedentes de la casa Sigma, y G6PDH (grado I) y NADPH de la casa Boehringer-Mannheim GmbH (BmG). En tanto no se indique lo contrario los restantes reactivos utilizados procedían de las casas Merk. y Carlo Erba.

Tampón Fosfato potásico 0,1 M pH 7,4.

Los metabolitos ensayados "in vitro" en concentraciones de 1,25, 2,50 y 5,00 mM han sido: ácido -fenilpirúvico, ácido 1- β -fenyllactico, ácido o-Hidroxi fenilacetico, ácido p-Hidroxi-fenillacético, p-Hidroxi fenillactico y feniletilamina, todos de la casa Sigma.

Para la determinación de proteínas se utilizaron los siguientes reactivos.

Albumina bovina (Fracción V, powder) suministrada por Armour Pharmaceutical Cl., Chicago, Illinois, USA.

Solución alcalina de cobre, preparada extemporáneamente.

Reactivo diluido de Folin Ciocalteu (Analema) que en el momento de hacer la determinación se diluyó a la mitad.

Líquido de desarrollo para determinación de HMG-CoA reductasa: benceno:acetona (1:1).

Líquidos de centelleo.

Acido tricloroacético 0,6M para determinación de aminoácidos en sangre y tejidos.

3.B.-Métodos

Se ha estudiado la actividad HMG-CoA reductasa en la fracción microsomal, como enzima principalmente implicada en el metabolismo del colesterol, en condiciones de hiperfenilalaninemia.

Por otro lado un punto secundario de regulación del metabolismo del colesterol lo constituye la conversión del ácido mevalónico a isopentenil pirofosfato. Este paso supone la intervención de tres reacciones: dos fosforilaciones catalizadas por las enzimas MVA cinasa y PMVA cinasa y una descarboxilación catalizada por la enzima PPMVA descarboxilasa. En este caso se han llevado a cabo experiencias para determinar las actividades enzimáticas respectivas en condiciones de hiperfenilalaninemia experimental.

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

De entre los numerosos métodos descritos en la Bibliografía, se ha elegido para llevar a cabo las determinaciones realizadas en el presente trabajo el Método de Shapiro y Rodwell (denominado TLC) (387) salvo ligeras modificaciones aportadas por Alexandre y col. (362).

3.B.1.1. Fundamento del Método Radiactivo

En esta técnica se mide la incorporación de radioactividad del sustrato marcado con ^{14}C (^{14}C -HMG-CoA) a mevalonato, producto de la reacción.

Se incluye un estándar interno de ^3H -mevalonato para permitir la corrección por pérdidas durante el aislamiento ulterior del producto formado.

Ya que se requieren 2 moléculas de NADPH + H^+ por molécula de sustrato transformado, frecuentemente se recurre a un sistema enzimático acoplado que regenere los equivalentes de reducción gastados a un ritmo adecuado.

En esta técnica el sistema regenerante está formado por glucosa 6-P, glucosa 6-P deshidrogenasa y NADP $^+$; de esta forma el coenzima oxidado durante la conversión de HMG-CoA en mevalonato es reducido de nuevo mediante la reacción:



Transcurrida la reacción, las mezclas son acidificadas con un doble objeto: inactivar la reductasa y convertir el ácido mevalónico en su lactona, de polaridad sensiblemente menor a la del sustrato (HMG-CoA) y sus hidrolizados, de los que puede entonces ser separada mediante técnica cromatográfica.

Posteriormente las δ - ^3H mevalonolactona y δ - ^{14}C mevalonolactona pueden ser detectadas cuantitativamente y por separado, mediante espectroscopia de centelleo líquido.

3.B.1.2.Técnica

La HMG-CoA reductasa es una enzima ligada a membranas microsomales, este hecho es ampliamente apoyado por la evidencia experimental. Por consiguiente y como paso previo a la reacción, es necesario separar la fracción microsomal del resto de componentes celulares.

Mediante centrifugación diferencial se puede obtener fácilmente esta fracción microsomal, y posteriormente se procede al planteamiento y desarrollo de la reacción enzimática, procediendo por último a la evaluación de modo cuantitativo de las actividades enzimáticas.

3.B.1.2.1.Aislamiento de los microsomas

Se ha seguido el procedimiento descrito por Dugan y col. (428) salvo ligeras modificaciones.

1. Los animales son sacrificados por decapitación a la hora elegida (12 a.m.), extrayéndoseles los órganos problema (Higado y Cerebro). En el caso del higado habrá de tomarse la precaución de no arrastrar consigo ni romper la vesicula biliar.

2. Una vez secos y pesados, los fragmentos de tejido se resuspenden en un tampón fosfato 50 mM, pH=7,4, que es además 30 mM en EDTA, 250 mM en ClNa y 1 mM en DTT.

La preparación del tampón requiere cierta precaución debido a que el EDTA basicifica considerablemente el medio. Para subsanar el problema es suficiente con disolver el EDTA, ClNa y DTT en un volumen adecuado de KH PO4 50 mM hasta conseguir un pH=7,4 y enrasar luego con tampón fosfato potásico 50 mM pH=7,4 hasta el volumen necesario para obtener las concentraciones adecuadas de cada uno de los tres componentes.

3. Se procede a la homogenización en un "Potter" mecánico, teniendo en cuenta que el recipiente que contiene la muestra ha de estar sumergido en un baño agua-hielo de ahora en adelante para evitar que modificaciones térmicas ambientales introduzcan cambios no controlados de actividad.

4. Los homogenados se someten a una primera centrifugación de 5,000 x g durante 15 min. a 4°C. Este primer paso tiene por objeto desprenderse de los restos

celulares groseros, para lo cual se deshecha el sedimento y se recupera el sobrenadante.

5. El sobrenadante de la etapa anterior se somete a una nueva centrifugación (15,000 x g) durante 15 min a 4°C. Durante esta centrifugación se sedimentan mitocondrias, lisosomas y partículas relacionadas.

6. Finalmente los sobrenadantes de la etapa anterior se centrifugan a 105,000 x g durante 60 min. (4°C), sedimentando la fracción microsomal integrada fundamentalmente por ribosomas y fragmentos de retículo endoplasmático liso y rugoso y aparato de Golgi.

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

8. Las suspensiones microsomales así obtenidas se conservan a 4°C hasta el momento de empezar la reacción o bien, se congelan mediante nitrógeno líquido en caso de realizar la reacción en días posteriores.

9. La concentración proteica de las suspensiones microsomales se determinan mediante el método de Lowry y col (429).

3.B.1.2.2. Reacción enzimática

La reproducción "in vitro" de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa implica la necesidad de adicionar a los extractos cantidades convenientes de sustrato y coenzima que van contenidos en un sistema regenerante.

En el presente trabajo la mezcla de la reacción contiene para un volumen final de 150 μ l.

a) 100 μ l de suspensión de microsomas previamente diluida en tampón de extracción hasta una concentración de 2 a 4 mg./ml. de proteínas.

El Tampón en el caso de las experiencias llamadas "in vitro", contiene para las muestras problema unas determinadas cantidades del metabolito ensayado para conseguir las concentraciones deseadas (1,25, 2,50 y 5,00 mM.). En otros casos el tampón contendrá una mezcla de los metabolitos ensayados a una concentración tal que en

la preincubación se encuentren a 0,25 mM.

Los Metabolitos ensayados son: Fenilpirúvico ; l-Fenilactico ; o-Hidroxi - fenilacético; p-Hidroxi-fenilacético; dl-p-Hidroxi-fenilactico y Feniletilamina.

b) 25 μ l de una mezcla de sistema regenerante que en ese volumen contiene: 4,6 moles G6P; 0,3 U.I. de G6PDH y 450 nmoles de NADP .

La mezcla se realiza en el mismo tampón de extracción. De esta forma el tampón es además 18 mM en NADP , 180 mM en G6P y 12000 U.I. de G6PDH por litro. Esta mezcla se realiza extemporaneamente.

c) 25 μ l de una disolución de HMG-CoA y ¹⁴C-HMG-CoA en las proporciones adecuadas para que el citado volumen contuviese 50 nmoles de sustrato de radioactividad específica comprendida entre 2000 y 5500 dpm/nmol. Como disolvente se utilizó tampón fosfato potásico 50 mM, pH=5,8 (la disolución se conservaba congelada a -20°C).

El procedimiento seguido se detalla a continuación:

1- Los 100 μ l de suspensión microsomal se introducen en tubos desechables de polietileno de 400 μ l de capacidad (tipo Beckman-B), provistos de tapón hermético y se preincuban a 37°C durante 15 min.

2- La reacción se inicia por adición de sustrato marcado (25 μ l) y de sistema regenerante (25 μ l) en este orden. Una vez bien cerrados los tubos, se agitan y se incuban a 37°C durante 15 min.

3- Transcurrido este tiempo la reacción se detiene con 25 μ l de una solución de ClH 10 N que a su vez acidifica el medio, induciendo la lactonización del mevalonato formado.

4- Así mismo, al terminar la reacción, se añaden 25 μ l de una solución tamponada de mevalonolactona y ³H-mevalonolactona tal que el volumen citado (25 μ l) contenga 0,78 mg. de lactona y entre 40000 y 160000 dpm y que constituye el estandar interno mediante el que pueden cuantificarse las pérdidas acumuladas durante la manipulación posterior.

Por otra parte actuará de portador facilitando el desarrollo en capa fina de las pequeñas cantidades de ^{14}C -mevalonolactona procedentes de la reacción enzimática. La mevalonolactona y la ^3H -mevalonolactona se conservan en soluciones bencénicas o toluénicas a -20°C . Para su utilización, se evaporan extemporaneamente en corriente de N_2 , y se resuspende en tampón de extracción.

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

6- Posteriormente los tubos se centrifugan durante 1 min. a $10,000 \times g$ (microfuga Beckman-B) para sedimentar las proteínas, y se conservan refrigerados hasta el momento de la cromatografía en capa fina.

3.B.1.2.3. Aislamiento y medida de los productos de reacción.

La MVA-lactona puede ser fácilmente separada de HMG-CoA y de sus productos de hidrólisis mediante cromatografía de capa fina, sobre unas placas de silicagel especiales en las que se aplican $50\mu\text{l}$ de cada uno de los sobrenadantes con ayuda de una micropipeta, secando posteriormente con calor suave.

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

El revelado se realiza con vapores de yodo.

Una vez determinada la zona donde se encuentra la MVA-lactona, se raspa sistemáticamente y se va depositando en los viales de centelleo. Sobre ellos se añaden 10 ml. de líquido de centelleo agitando vigorosamente durante 15 seg., guardándose después refrigerados y protegidos de la luz hasta el momento del contaje.

El líquido de centelleo utilizado contiene:

7g. de PPO

0,3 g. de dimetil-POPOP.

100 g. de Naftaléno.

Todo ello disuelto en 1 litro de Dioxano.

Este liquido de centelleo, asi preparado, se deja reposar varias horas y se agita despues hasta disolución total. Debe conservarse en frasco de color topácio y durante un tiempo no superior a 2-3 semanas.

Además del conjunto de viales problema, cada experiencia contaba con dos viales más de 25 μ l de ^3H -MVA-lactona que se añadian al detener la reacción.

3.B.1.2.4. Calculos y tratamiento estadístico.

La actividad específica del enzima, se calcula a partir de la expresión siguiente:

$$Ae = \frac{\text{DPM } ^3\text{Hp} \times \text{DPM } ^{14}\text{Cm}}{\text{DPM } ^3\text{Hm} \times \text{Re} \times \text{P} \times \text{T}}$$

Ae= Actividad específica de la HMG-CoA-reductasa expresada en pmoles \times min. \times mg. proteínas $^{-1}$

DPM ^3Hp = Desintegraciones por minuto de ^3H contenido en el patrón.

DPM ^3Hm = Desintegraciones por minuto de ^3H contenido en la muestra.

DPM ^{14}Cm = Desintegraciones por minuto de ^{14}C contenido en la muestra.

Re= Radiactividad específica del HMG-Coa en DPM/nmol.

P= mg. de proteínas presentes en la muestra.

T= Tiempo de incubación en minutos.

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

Los resultados se expresan como valores medios de 2 a 3 experiencias en cada una de las cuales se hicieron 4 determinaciones como mínimo y se acompañan del error estandar de la media.

El tratamiento estadístico se realizó mediante la aplicación de la t de Student.

3.B.2. Estudio de la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico.

Las técnicas empleadas han sido basicamente las descritas por Ramachandran y Shah (408) quienes midieron la incorporación de ^{14}C a PMVA, FPMVA y CO_2 . El procedimiento seguido se describe a continuación.

3.B.2.1. Preparación de los extractos enzimáticos.

Los animales fueron sacrificados por decapitación a la hora adecuada (10 a.m.).

Los órganos fueron extraídos e introducidos rápidamente en recipientes con solución salina al 9% y puestos en baño hielo.

Se tomaron órganos de 5 animales como mínimo y una vez secos y pesados fueron triturados y se homogeneizaron posteriormente en un "Potter" mecánico, en un tampón fosfato potásico 0,1 M pH=7,4 que es además 1mM en EDTA, 4mM en Cl_2Mg , y 10 mM en β -ME.

La proporción tejido/tampón fué distinta según el órgano utilizado. Así, para el hígado fué de 1:10 (p/v) y para el cerebro 1:8 (p/v).

Durante esta operación y en lo sucesivo las muestras estarán introducidas en un baño de agua-hielo para mantener la temperatura adecuada a 4°C.

El homogeneizado así obtenido, fué sometido a una centrifugación de 105,000 x g a 4°C durante 60 min.

El sedimento fué desechado, utilizándose el sobrenadante como preparación enzimática (llamado de ahora en adelante S 105).

Para obtener la concentración proteica deseada se hicieron diluciones apropiadas con el tampón utilizado para la preparación de los extractos.

La concentración proteica se determinó también en este caso por el método de Lowry y col (429) basado en una asociación de las reacciones de Biuret y de Folin, la primera, característica del enlace peptídico y de la función amina, y la segunda, de los grupos aromáticos de la tirosina y del tiptófano.

3.B.2.2. Fosforilación del ácido mevalónico

3.B.2.2.1. Reacciones enzimáticas.

Para la determinación de las cantidades de PMVA y PPMVA formados por la acción de la MVA cinasa y PMVA cinasa, se han utilizado a menos que se indique lo contrario, la siguiente mezcla de reacción, contenida en un volumen final de reacción de 1 ml.

a) 700 μ l de tampón fosfato potásico 0,1 M pH=7,4 (70 mol)

b) 50 μ l de Cl Mg (5,5 mol) en agua destilada.

c) 150 μ l de ATP (3,5 mol) en tampón fosfato potásico.

d) 50 μ l. de RS [1-¹⁴C] MVA en distintas concentraciones según se hayan realizado las experiencias en hígado o cerebro. Así, en el caso del hígado se han utilizado 68,25 nmol (139,5 x 10 dpm) mientras que para cerebro la cantidad de MVA presente en la reacción era de 34,13 nmol (67,77 x 10 dpm).

e) 50 μ l del sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 105,000 x g adecuadamente diluido con el Tampón de extracción de forma que la cantidad de proteínas de la mezcla fuese de 150 a 300 μ g.

En el caso de los tubos problemas las cantidades de tampón añadidas fueron de 200 μ l y los restantes 500 μ l hasta completar el volumen final fueron añadidos de una mezcla del mismo tampón que llevaba disuelta una cantidad de cada metabolito (Fenilpirúvico, Fenilacético...etc) de tal forma que la concentración final en la mezcla fuese

respectivamente de 1,25; 2,50; y 5,00 mM de cada uno de los metabolitos.

La reacción se llevó a cabo en tubos de centrifuga.

1- Se procedió a la preincubación de los tubos (conteniendo el extracto con el tampón o bien con los Metabolitos) durante 10 min., una vez elegido este tiempo entre varios probados anteriormente.

2- Más tarde se adicionó a los tubos 1-¹⁴C-MVA para comenzar la reacción, manteniendose la misma en incubación a 37°C durante 30 min.

La reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño con agua hirviendo durante 5 min. A continuación se dejaron enfriar y el precipitado se separó por centrifugación a 4000 rpm. durante 5 min. a temperatura ambiente.

3.B.2.2.2. Detección y medida de los productos de reacción

El PMVA y PPMVA fueron separados por radiocromatografía en papel mediante los siguientes pasos:

1- Se prepararon papeles de cromatografía donde se señalaron con lapiz tiras de 285 mm. de largo por 35 mm. de ancho. El papel utilizado fue Whatman n° 1.

2- Alicuotas de 50µl del sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 4,000 rpm. fueron aplicadas a cada tira a 30 mm. del origen del papel, realizandose el secado de las manchas con una corriente de aire caliente.

3- Los cromatogramas fueron introducidos en campanas de vidrio herméticamente cerradas en las que se habia colocado el liquido de desarrollo. El liquido empleado ha sido: butanol: ácido formico: agua (77: 10: 13) que se introdujo unas tres horas antes de la colocación de los papeles a fin de asegurar una perfecta saturación de las campanas.

4- El desarrollo ascendente tuvo un tiempo de duración de aproximadamente 14 horas y una vez finalizado, los cromatogramas fueron colgados para el secado a temperatura ambiente, señalandose previamente el frente alcanzado por el liquido de desarrollo.

Las tiras de papel se recortaron y se procedió a la localización del PMVA y PPMVA haciendolos pasar por el sistema "Actigraph III" constituido por dos detectores tipo Geiger de flujo gaseoso situados muy proximos entre los cuales pasa el cromatograma. Los impulsos producidos pasan a un registrador obteniéndose una gráfica en la que cada pico corresponde a una sustancia marcada radiactivamente. Como gas portador se ha utilizado el gas Q (butano:helio 10:0,1).

Se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo:

Escala: 1000; Velocidad: 30; Anchura de colimador: 12; Constante de tiempo:10.

En este liquido de desarrollo los valores de Rf, observados para el PMVA, PPMVA asi como para el MVA que ha quedado sin reaccionar fueron los siguientes:

Producto	Rf
-----	---
PPMVA	0,01-0,05
PMVA	0,05-0,15
MVA	0,75

6- Una vez localizadas, las zonas correspondientes a PMVA y PPMVA fueron recortadas e introducidas en viales de centelleo. El liquido de centelleo empleado(10 ml./vial) ha sido:

Tolueno.....1000 ml.
PFO.....5g.
FOPOP.....0,3g.

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

3.B.2.2.3. Calculos.

Las cantidades de PMVA y PPMVA expresados en nmoles de producto obtenido en la reacción por miligramo de protena y por 30 min. de reacción se calculan segun la siguiente expresión:

$$\text{nmol/mg prot/30 min} = \frac{\text{Dpm muestra} \times V_f \times \text{Dpm T}}{\text{mg prot/ml} \times V_e \times \text{Dpm E} \times \text{AE} \times V_m}$$

Dpm muestra = Dpm obtenidas al medir la radioactividad de la muestra en el contador de centelleo.

V_f = Volumen final del medio de reacción.

Dpm T = Dpm. teóricas del patrón de ^{14}C utilizado.

mg prot./ml. = Concentración proteica del extracto utilizado.

V_e = Volumen del extracto utilizado.

V_m = Volumen de la alicuota utilizada como muestra en la cromatografía.

Dpm E = Dpm. obtenidas al medir la radioactividad del patrón de ^{14}C utilizado en el contador de centelleo.

AE = Dpm/nmol del ^{14}C utilizado en el medio de reacción.

La fosforilación total del MVA, que es un reflejo de la actividad MVA cinasa, se obtuvo sumando las cantidades de PMVA, PPMVA y CO_2 .

La fosforilación del PMVA, que es la medida de la actividad PMVA cinasa, se calculó sumando las cantidades de PPMVA y CO_2 formadas en la reacción.

Por ultimo la descarboxilación total que equivale a la medida de la actividad PPMVA descarboxilasa viene dada por la cantidad de CO_2 formado.

El error estandar de la media se calcula a partir de la formula descrita por Young (430) para propagación de errores.

Asi, para la actividad PMVA cinasa, el valor del SEM será:

$$\text{SEM} = \text{SEMa} + \text{SEMb}$$

Y para la actividad MVA cinasa:

$$\text{SEM} = \text{SEMa} + \text{SEMb} + \text{SEMc}$$

Siendo:

SEMa= Error estandar de la media de las observaciones de cantidad de CO_2 formado.

SEMb= Error estandar de la media de las observaciones de PPMVA.

SEMc= Error extandar de la media de las observaciones de PMVA.

3.B.2.3. Descarboxilación del MVA.

3.B.2.3.1. Reacción enzimática.

Para medir la descarboxilación del ácido mevalónico se ha utilizado la siguiente mezcla de reacción:

a) 600 μ l de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH=7,4.

En el caso de las muestras problema la cantidad de tampón añadida fué de 100 l, estando los restantes 500 l constituidos por una mezcla del mismo Tampón y una cantidad de metabolito suficiente para obtener una concentración de 1,50 mM 2,50 mM y 5,00 mM de cada uno de ellos.

Igualmente que en los casos ensayados anteriormente los metabolitos probados fueron Fenilpiruvico, Fenilacético..etc.

b) 50 μ l de Cl_2Mg (5,5 μ mol) en agua destilada.

c) 150 μ l de ATP (3,5 μ mol) en tampón fosfato potásico 0,1 M pH=7,4.

d) 50 μ l de RS MVA [$1-^{14}C$] en distintas concentraciones según el órgano de que se trate. Así, en el caso del hígado se han utilizado 68,25 nmol ($139,5 \times 10^3$ dpm) mientras que en el cerebro la cantidad fué de 34,13 nmol ($67,75 \times 10^3$ Dpm)

e) 150 μ l del sobrenadante obtenido tras la centrifugación a $105,000 \times g.$, adecuadamente diluido con el tampón de extracción, de tal forma, que la concentración proteica de la muestra estuviese comprendida entre 500 y 1000 μ g.

La reacción se llevó a cabo en matraces cónicos de 25 ml. provistos de tapón de goma y un pocillo central de aproximadamente 1 cm. de diámetro.

En el interior del pocillo se introdujeron 0,4 ml. de NaOH al 12%, con el fin de que ésta absorba el CO_2 desprendido en la reacción.

La preincubación se llevó a cabo durante 10 minutos, una vez elegido este tiempo entre varios probados.

La reacción se inició con la adición de los 50 μ l de RS [1-¹⁴C] MVA a los matraces, y estos se mantuvieron herméticamente cerrados y en incubación a 37°C durante 30 min. con agitación (aproximadamente 70 oscilaciones por minuto).

La reacción se detuvo mediante inyección con una jeringuilla de 0,5 ml, de SO₄H₂ al interior del matraz. Una vez detenida la reacción, los matraces fueron sometidos a otros 60 minutos de agitación a fin de asegurar el desprendimiento de CO₂ del medio de incubación y su absorción sobre la sosa del pocillo central.

Finalizado este periodo, se abrieron los matraces para proceder a tomar muestra del contenido de los pocillos.

3.B.2.3.2. Detección y medida de los productos de reacción.

Se tomaron alicuotas de 100 μ l del contenido del pocillo central introduciéndolas en viales de centelleo que habían sido llenados previamente con 10 ml. de líquido de centelleo.

El objeto de añadir la muestra sobre el líquido es reducir al máximo la posible precipitación de la muestra en el interior del vial.

Para este caso el líquido empleado ha sido:

Tolueno.....	1500 ml.
Metanol.....	500 ml.
PPD.....	2 g.
POPOP.....	0,02 g.

Tras una agitación fuerte se procedió a las determinaciones de radioactividad en un contador de centelleo líquido.

3.B.2.3.3. Cálculos.

La cantidad de CO₂ formado por acción de la pirofosfomevalonato descarboxilasa expresado en nmoles por mg. de proteína por 30 min. de reacción se calculó aplicando la fórmula:

$$\text{nmol/mg.Prot./30 min} = \frac{\text{Dpm muestra} \times V_f \times \text{Dpm T}}{\text{mg.prot/ml} \times V_e \times V_m \times \text{Dpm E} \times \text{AE}}$$

Dpm muestra = Dpm obtenidas al medir la radioactividad de la muestra en el contador de centelleo líquido.

V_f = volumen del contenido del pocillo central.

Dpm T = Dpm del patrón de ¹⁴C utilizado.

mg. prot./ml. = Concentración proteica del extracto enzimático utilizado.

V_e = Volumen del extracto utilizado en la reacción.

V_m = Volumen de la muestra tomada del pocillo central.

Dpm E = Dpm. obtenidas al medir la radioactividad del patrón de ¹⁴C utilizado en el contador de centelleo líquido.

AE = Dpm/nmol del [1-¹⁴C] MVA utilizado en la mezcla de reacción.

La fosforilación total del MVA, que es un reflejo de la actividad MVA cinasa, se obtuvo sumando las cantidades de PMVA y PPMVA, a la cantidad de CO₂ formados en la reacción.

De manera similar, la fosforilación del PMVA (medida de la actividad PMVA cinasa) se calculó sumando las cantidades de PPMVA y CO₂ formados.

La descarboxilación total (medida de la actividad pirofosfomevalonato descarboxilasa) viene determinada por la cantidad de CO₂ formado.

3.B.3. Tratamiento de tejidos para la determinación de Aminoácidos y de la relación fenilalanina/tirosina.

Antes de ser sacrificados los animales y previa anestesia con eter, se les extrae sangre a nivel de la arteria femoral y se deposita esta en tubos con anticoagulante (heparina).

Mas tarde, se sacrifican los animales por decapitación, extrayendo el higado y cerebro que una vez secos y pesados, se homogenizan rapidamente en un "Potter" mecánico con agua-hielo, en una proporción 1:3 (g/ml).

Con la sangre obtenida se procede por centrifugación ala obtención de plasma. Una vez obtenido, se añade la misma cantidad de plasma que de tricloroacetico 0,6 M y se dejan los tubos en reposo 20 min., despues de los cuales, se vuelve acentrifugar durante 5 min. a 3,000 x g., obteniendose un sobrenadante claro, listo para el analisis de aminoácidos.

Con los tejidos de cerebro e higado y una vez homogeneizados se procede a la centrifugación durante 15 minutos a 15,000 x g. A continuación se procede con el sobrenadante de igual forma que con el plasma, añadiendo identica cantidad de ácido tricloroacético 0,6 M, dejando 20 min. en reposo , despues de los cuales por centrifugación durante 5 min. a 3,000 x g, se obtienen unos sobrenadantes claros que estan listos para el análisis de aminoácidos.

3.B.3.1. Determinaciones analíticas

Para el análisis de aminoácidos se ha empleado un autoanalizador de aminoácidos marca Rank-Hilger mod. Chromaspec-J80.

Los extractos de sangre y tejidos obtenidos segun se describe en el punto 3.B.3 sediluyen con una solución de ácido sulfosalicílico al 1% con norleucina (20 nmoles/ml), en una proporción que en sangre es de 1/5 y en higado y cerebro de 1/15. De esta forma se inyectan en el autoanalizador junto al patrón de aminoácidos.

3.B.3.2. Cálculo de las concentraciones de aminoácidos en muestras problema.

Las concentraciones de los diferentes aminoácidos existentes en las muestras procedentes de plasma, higado y cerebro, se han determinado de acuerdo con la siguiente

expresión:

$$C = Fr \times Am \times Fd \times R' \times 100 \text{ ml.}$$

C= Concentración en moles/100 ml. de muestra.

Am= Area de cada aminoácido en el aminograma correspondiente a cada muestra problema.

Fr= Factor de resolución para cada aminoácido que se ha definido como:

$$Fr = \frac{\text{Concentración de cada aminoácido en el patrón}}{\text{Area de cada aminoácido en el patrón.}}$$

Fd= Factor de dilución de la muestra.

R'= Factor de corrección de toma de muestra el cual viene expresado como el cociente entre el area de la norleucina en el patrón y el area de la norleucina en el problema.

RESULTADOS.

4. RESULTADOS.

4.A. Determinación de la estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico en relación a la temperatura.

Una vez adoptadas las condiciones óptimas para el estudio de la fosforilación y descarboxilación del MVA según Gonzalez-Pacanowska (411) y utilizando [1-¹⁴C] MVA como sustrato de la reacción, hemos determinado las actividades enzimáticas a lo largo del tiempo, estando los extractos conservados a 4°C.

Considerando además las variaciones con la edad sufridas por determinadas enzimas lipogénicas y los cambios metabólicos que tienen lugar en el pollo durante los días inmediatamente posteriores a la eclosión, se han determinado las actividades enzimáticas a los 15 días de vida de los animales. A esta edad las tres enzimas ensayadas se encuentran perfectamente estabilizadas en relación a los cambios postnatales.

En la TABLA 4 (FIG. 10) se muestran los resultados en el caso de las enzimas hepáticas. Ya a las 24 horas de conservación a 4°C se aprecia una disminución significativa de la actividad PPMVA descarboxilasa que continua disminuyendo progresivamente hasta las 72 horas que constituye el periodo de tiempo ensayado. Las cinasas no sufren cambios apreciables en su actividad hasta las 72 horas, lo cual demuestra que son unas enzimas más resistentes o más estables a lo largo del tiempo a una temperatura determinada.

Las actividades enzimáticas cerebrales se muestran en la TABLA 5 (FIG. 11). La PPMVA descarboxilasa a las 24 horas de conservación a 4°C no sufre variación en su actividad empezando a las 48 horas a apreciarse una inactivación significativa, mientras que las actividades MVA cinasa y PMVA cinasa no varían a lo largo del periodo ensayado.

De igual modo se han medido las actividades enzimáticas a lo largo del tiempo estando los extractos conservados a -4°C.

La TABLA 6 (FIG. 12) es ilustrativa del hecho de que los extractos hepáticos congelados mantienen unas actividades FPMVA descarboxilasa, MVA cinasa y PMVA cinasa estables durante el periodo de tiempo ensayado (168 horas).

Igualmente, como se puede apreciar en la TABLA 7 (FIG 13) las actividades enzimáticas cerebrales una vez mantenidos los extractos a -4°C no sufren inactivación alguna a lo largo de las 168 horas ensayadas.

Estos resultados nos llevan a considerar la posibilidad de que una vez obtenidos los extractos enzimáticos, estos puedan conservarse congelados hasta el momento oportuno para su determinación enzimática. En nuestras experiencias, este momento no ha excedido en ningún caso de una semana a partir de la obtención de los extractos.

TABLA 4.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico.
Influencia de la temperatura en la conservación de las actividades enzimáticas en hígado.
Conservación a 4°C

Tiempo (h.)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
0	84,86±3,22	102,14±2,57	34,72±0,10	119,58±3,20	221,72±4,10
24	70,88±5,90	100,13±2,50	33,08±0,02 ***	103,96±5,90	204,09±6,40
48	72,17±7,10	100,01±2,10	30,02±0,01 ***	102,19±7,10	202,20±7,40
72	69,18±8,10	98,50±2,30	25,00±0,05 ***	94,18±8,10	192,68±8,40

Los resultados se expresan como la media de cuatro determinaciones ± S.E.M.
P = niveles de significación de la t de Student; P<0,0005 ***

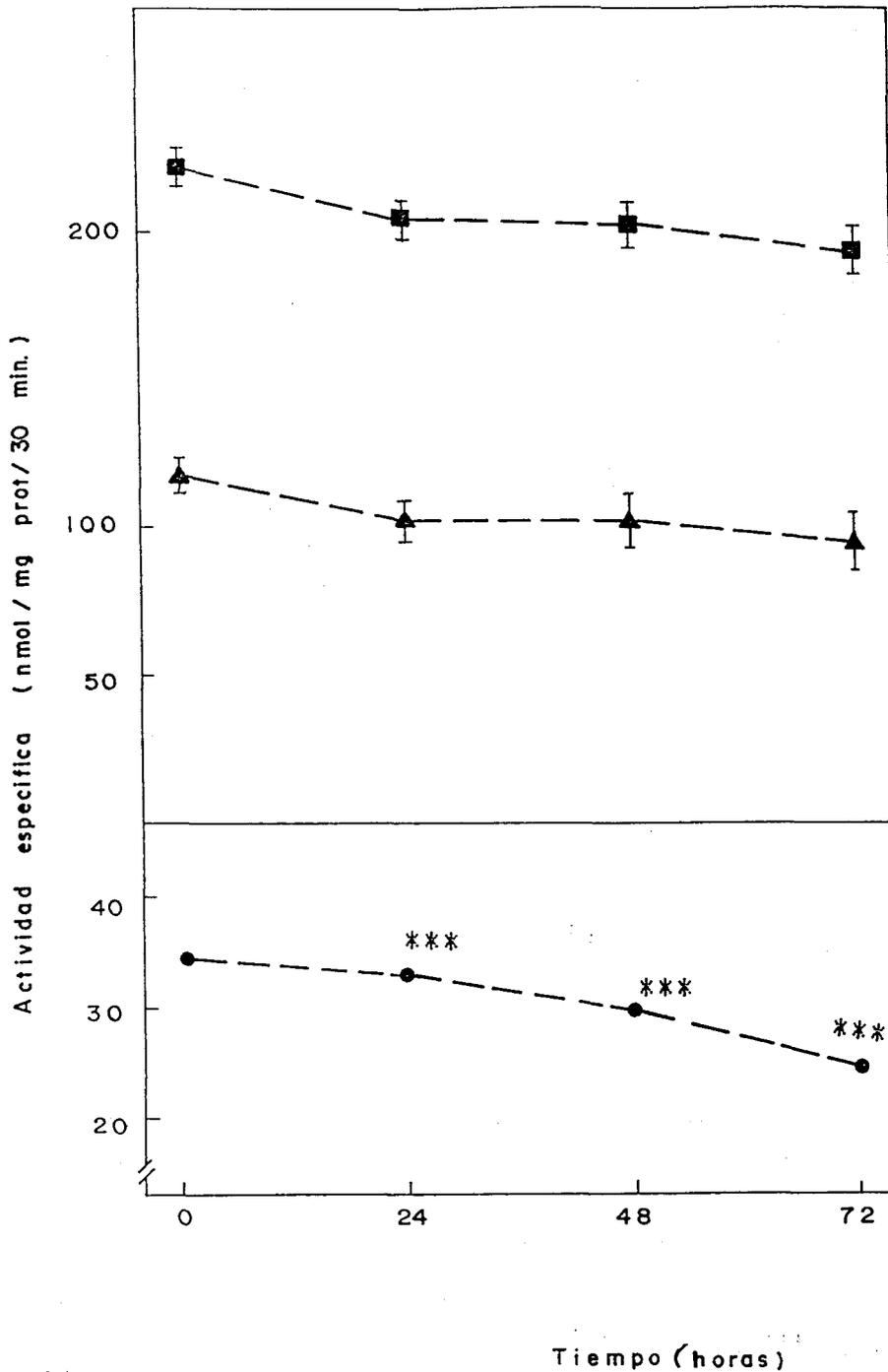


FIG. 10.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura (4°C) en las actividades enzimáticas de hígado a lo largo del tiempo. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

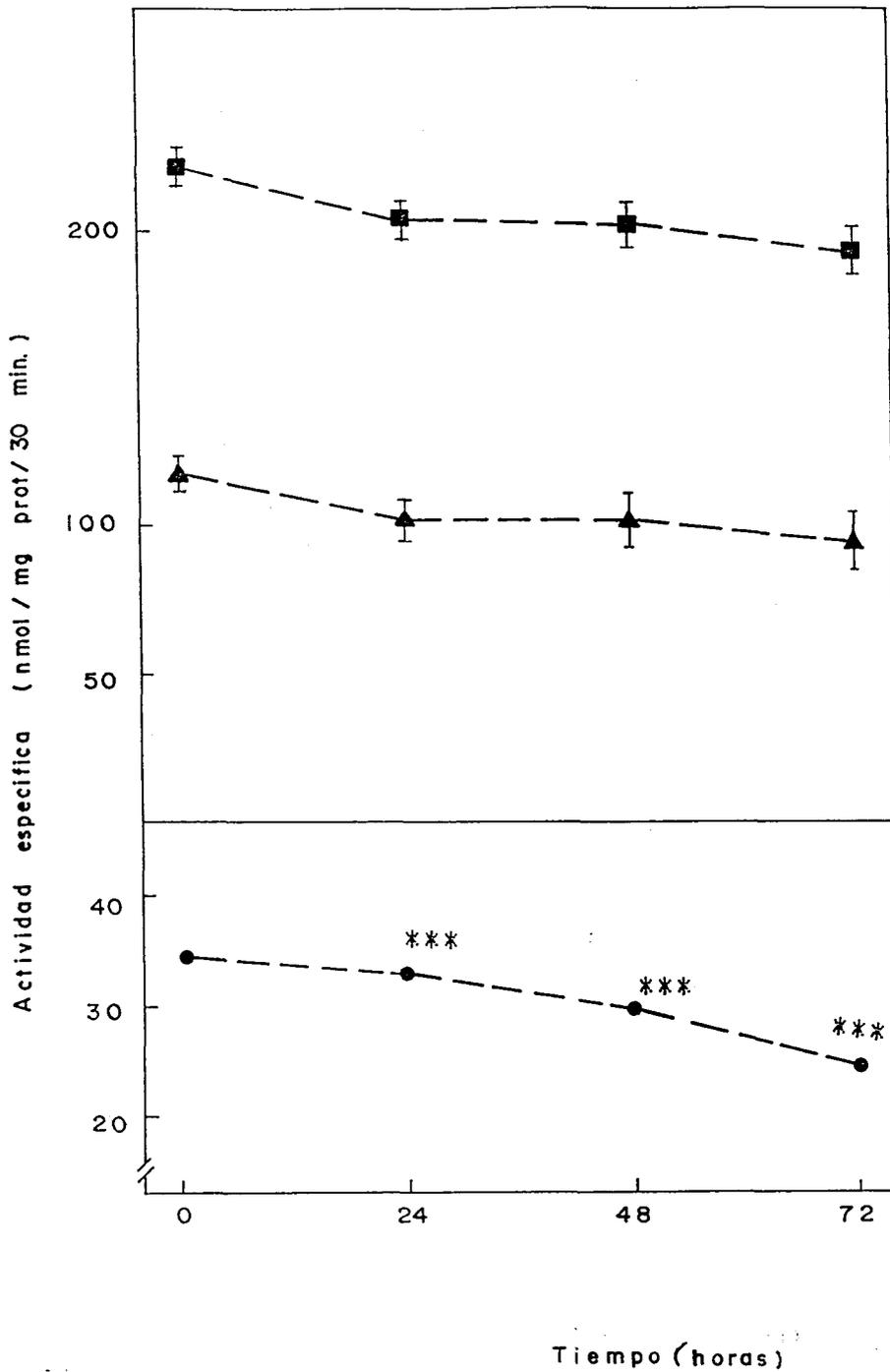


FIG. 10.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura (4°C) en las actividades enzimáticas de hígado a lo largo del tiempo. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

TABLA 5.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico.
Influencia de la temperatura en la conservación de las actividades enzimáticas en cerébro.
Conservación a 4°C

Tiempo (h.)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
0	37,12±4,70	70,30± 7,90	15,87±0,01	52,99±4,20	123,29± 9,20
24	34,47±4,75	68,31±16,00	16,12±0,02	50,59±4,70	118,90±16,60
48	29,40±4,70	60,50±17,00	13,21±0,02	42,61±4,70	103,10±17,60
72	30,15±5,20	60,08±17,06	12,89±0,01 ** ***	43,04±5,20	103,10±17,80

Los resultados se expresan como media de cuatro determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,005 ** ; P<0,0005 ***

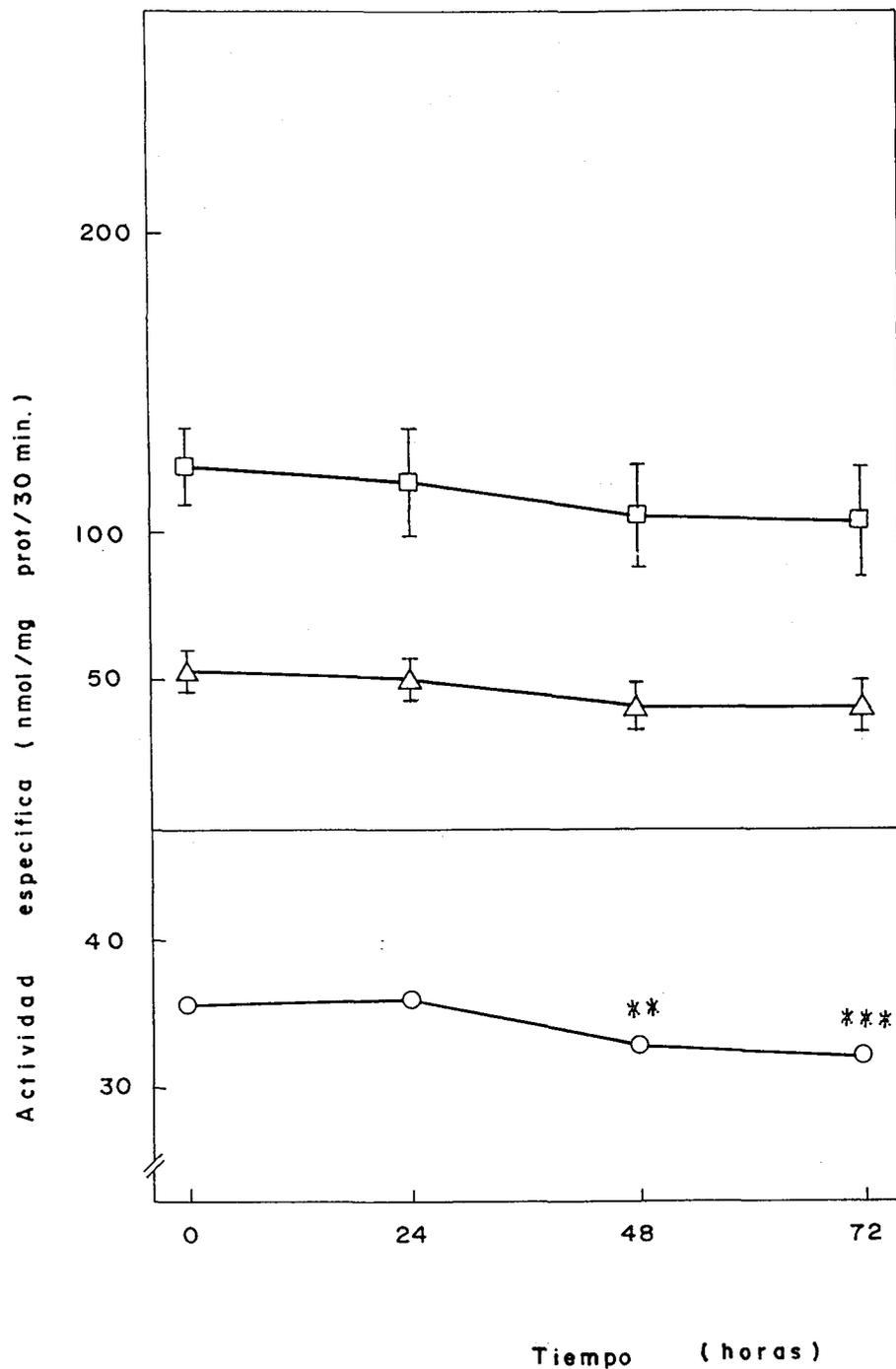


FIG. 11.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura (4°C) en las actividades enzimáticas de cerebro a lo largo del tiempo. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

TABLA 6.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura en la conservación de las actividades enzimáticas en hígado. Conservación a -4°C.

Tiempo (h.)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
0	52,02±0,11	103,74± 0,77	35,48±0,01	87,50±0,10	191,20± 0,70
24	53,33±0,04	100,55± 0,86	35,12±0,65	88,45±0,60	188,40± 1,00
48	50,04±0,30	102,61± 7,20	34,81±0,70	84,85±0,70	187,40± 7,20
168	50,56±3,20	123,32±10,2	35,06±0,10	85,62±3,20	208,90±10,70

Los resultados se expresan como la media de cuatro determinaciones ± S.E.M.

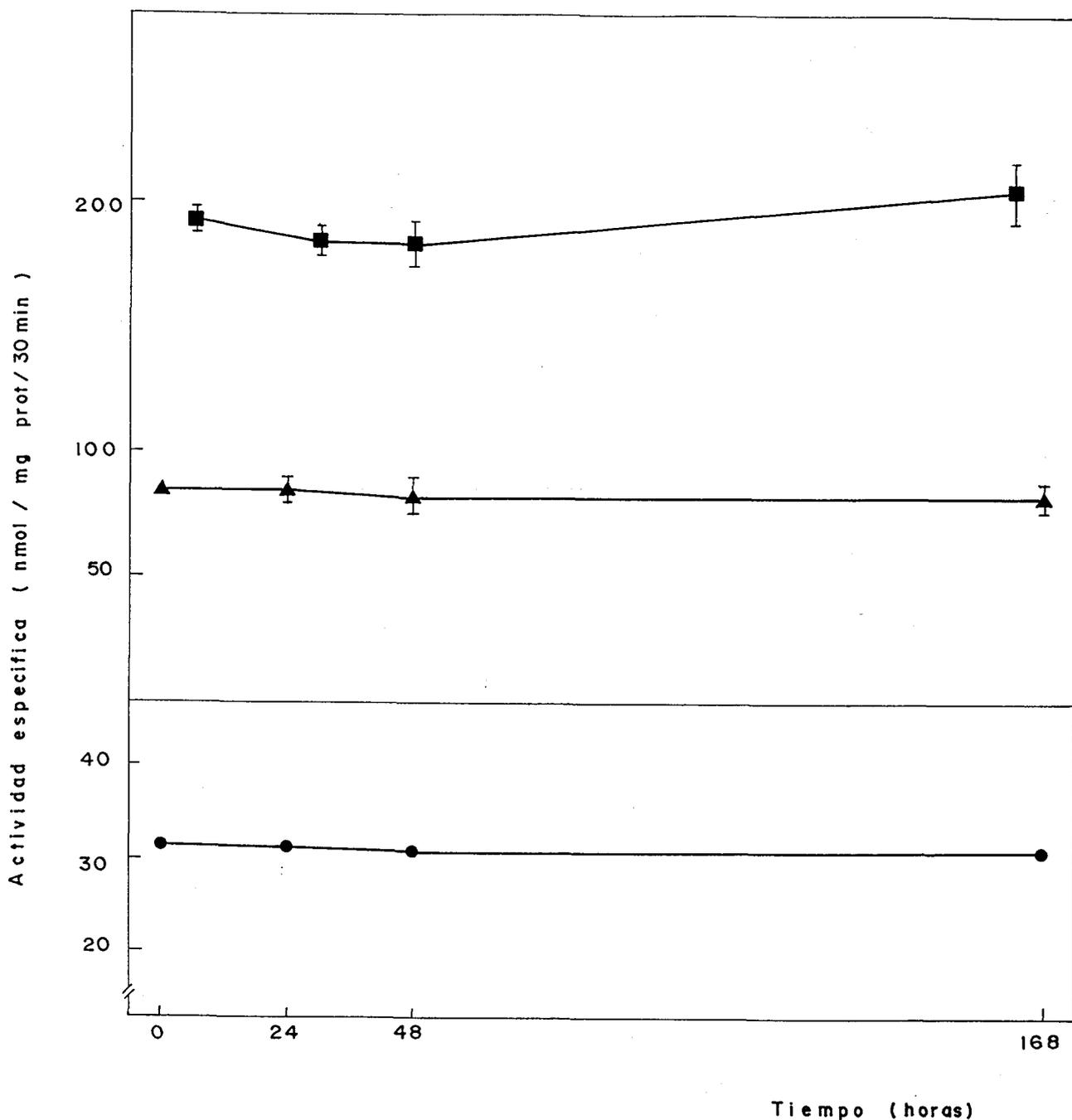


FIG. 12.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura (-4°C) en las actividades enzimáticas de hígado a lo largo del tiempo. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

TABLA 7.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura en la conservación de las actividades enzimáticas en cerébro. Conservación a -4°C.

Tiempo (h.)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
0	38,37± 5,10	80,01± 0,10	16,05±0,30	54,42± 5,10	134,43± 5,10
24	39,40± 6,10	99,10± 0,12	16,15±0,20	55,55± 6,11	154,65± 6,10
48	36,30±10,10	80,10± 9,10	15,80±0,41	52,10±10,10	132,20±13,60
168	35,40± 6,10	81,31±10,21	16,07±0,01	51,47± 6,10	132,7 ±11,81

Los resultados se expresan como la media de cuatro determinaciones ± S.E.M.

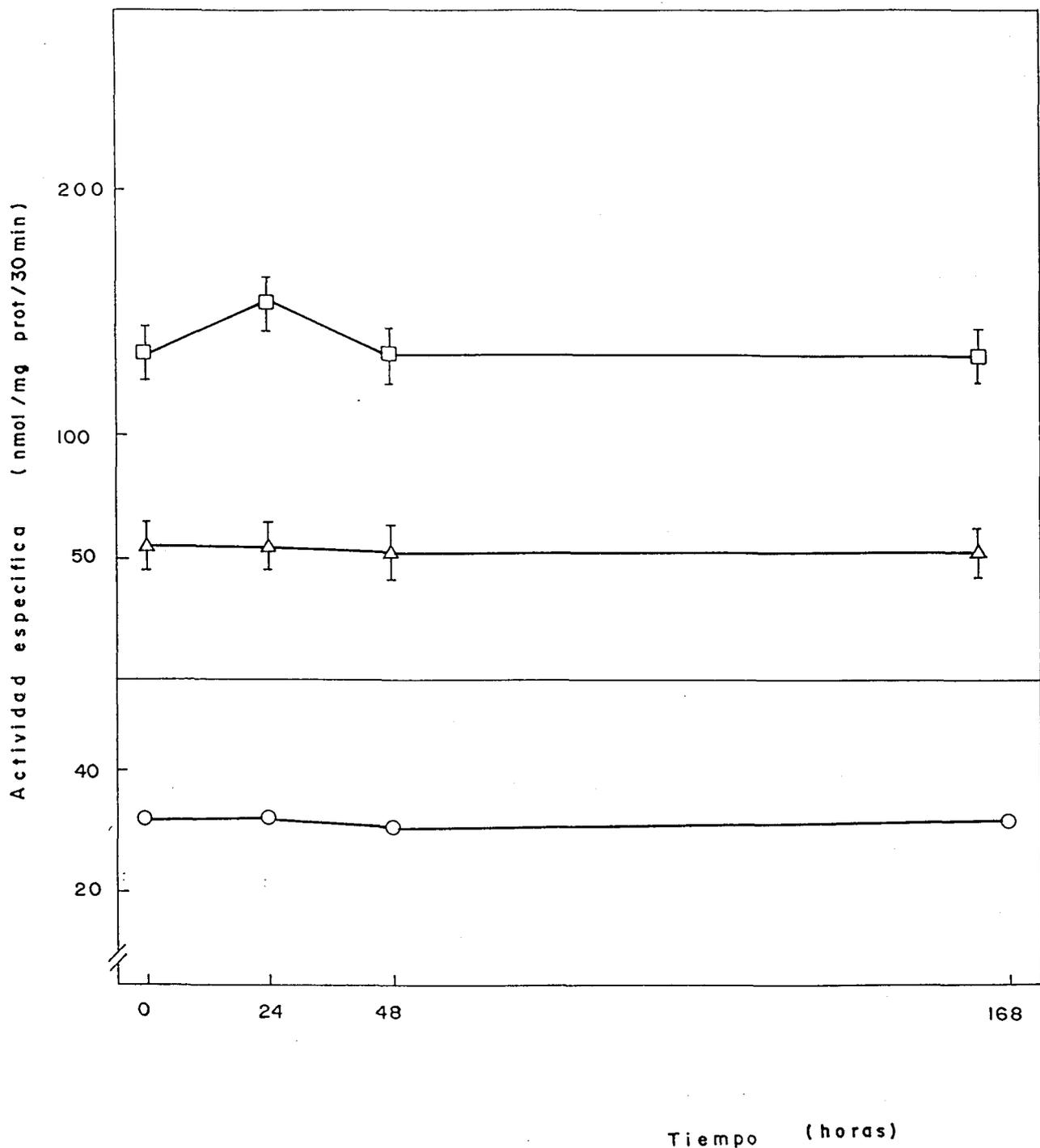


FIG. 13.-Estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico. Influencia de la temperatura (-4°C) en las actividades enzimáticas de cerebro a lo largo del tiempo. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

4.B. Influencia de la preincubación sobre las actividades enzimáticas.

Al comenzar nuestro estudio sobre la posible acción de algunos metabolitos de la fenilalanina sobre las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico, consideramos la importancia de poner en contacto durante algunos minutos a la enzima con su posible agente inhibidor, es decir de introducir un tiempo de preincubación antes de la reacción enzimática.

De los resultados expuestos en la TABLA 8 (FIG. 14) se deduce que si bien la PPMVA descarboxilasa de hígado en contacto con el fenilpirúvico a una concentración de 2,5 mM se inhibe aun en el caso de no contar con ningún tiempo de preincubación, esta inhibición es más significativa si existe un tiempo de contacto entre la enzima y su inhibidor (20 min.)

La TABLA 9 (FIG. 14) muestra los resultados obtenidos en el caso del cerebro, pudiéndose apreciar igualmente que con un tiempo de preincubación determinado (20 min.) la inhibición producida en la actividad descarboxilasa es más pronunciada.

Las actividades MVA cinasa y PMVA cinasa no se modifican por acción del ácido fenilpirúvico en ningún caso. No obstante a lo largo de numerosas experiencias estas actividades enzimáticas se han determinado sistemáticamente.

La FIG. 14 constituye una comparación ilustrativa del hecho de que la preincubación aumenta considerablemente el efecto inhibidor, siendo este solo muy ligeramente superior en cerebro.

TABLA 8.- Efecto de la preincubación durante 20 min. con un metabolito de la fenilalanina (fenilpirúvico) sobre las actividades enzimáticas PPMVA descarboxilasa, MVA cinasa y PMVA cinasa de hígado.
Concentración del metabolito 2,5 mM.

	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
Controles	52,90±19,9	114,80±18,8	35,20±0,90	88,10±19,90	202,90±27,30
Sin Pre- incubar.	49,90± 1,00	149,20± 0,10	25,30±2,80 *	75,20± 2,90	224,40± 2,90
Con Pre- incubac.	60,9± 1,20	163,30± 2,10	18,64±1,20 ***	79,54± 1,60	242,80± 2,70

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,0005 ***

TABLA 9.- Efecto de la preincubación durante 20 min. con un metabolito de la fenilalanina (fenilpirúvico) sobre las actividades enzimáticas PPMVA descarboxilasa, MVA cinasa y PMVA cinasa de cerebro.
Concentración del metabolito 2,5 mM.

	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
Controles	32,80±7,20	98,40±2,50	17,20±1,51	50,00±7,30	148,40±7,70
Sin Pre- incubar	36,50±5,50	95,50±0,30	12,10±1,41 *	48,60±5,60	144,10±5,60
Con Pre- incubac.	40,80±3,30	105,3±3,33	8,35±0,12 **	49,15±3,30	154,45±4,60

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

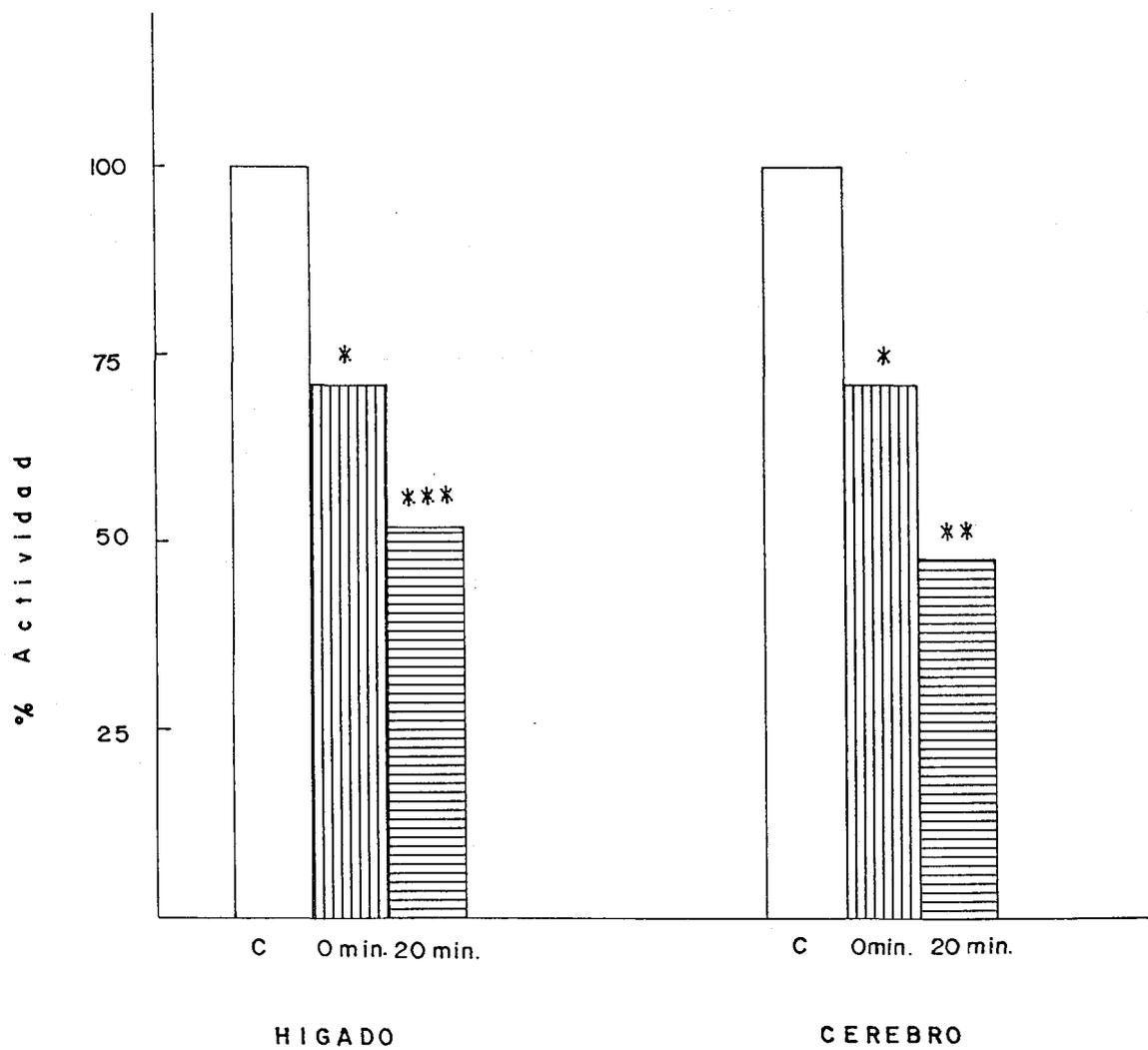


FIG. 14.-Efecto de la preincubación durante 20 min. con un metabolito (fenilpirúvico) sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Concentración del fenilpirúvico 2,5 mM. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro

Una vez establecida la necesidad de contar con un tiempo de preincubación, pasamos a determinar cual seria el tiempo ideal para lo cual se realizaron las experiencias que se exponen en las TABLAS 11 y 12.

En la TABLA 10 (FIG.15) aparecen los resultados obtenidos en hígado utilizando distintas concentraciones de fenilpirúvico y durante dos tiempos de preincubación distintos: 10 y 20 minutos. Como se puede apreciar, los resultados son bastante semejantes en ambos casos.

En la TABLA 11 (FIG. 15) se expresan los resultados obtenidos en el caso del cerebro en idénticas condiciones a las experiencias de hígado. En este caso se puede apreciar asimismo que entre 10 y 20 min. de preincubación los resultados no sufren variación apreciable.

A partir de estos datos y en lo sucesivo escogeremos 10 min. como tiempo de preincubación para experiencias posteriores.

TABLA 10.- Influencia de distintos tiempos de preincubación con fenilpirúvico sobre las actividades enzimáticas FPMVA descarboxilasa, MVA cinasa y PMVA cinasa de hígado

10 minutos de preincubación

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	FPMVA	PMVA	FPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	56,60±28,70	162,30±4,50	34,76±0,30	91,36±28,71	253,60±29,00
2,50	64,50± 3,29	150,80±5,10	18,86±3,10 **	83,36± 3,20	234,10± 6,01
5,00	70,10± 4,20	171,20±7,10	12,85±2,81 **	82,95± 5,00	254,11± 8,91
10,00	54,30±7,20	180,50±5,10	5,86±3,20 ***	60,16± 7,92	240,61± 9,32

20 minutos de preincubación

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	FPMVA	PMVA	FPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	56,60±28,70	162,30±4,50	34,76±0,30	91,36±28,70	253,60±29,01
2,50	69,30± 8,10	165,30±5,10	20,18±4,11 *	89,48± 9,01	254,70±10,41
5,00	70,30± 5,80	120,40±7,20	11,08±3,11 **	81,38± 6,52	201,81± 9,70
10,0	85,30± 7,10	160,10±8,20	6,02±5,70 *	91,32± 9,11	251,40±12,21

Los resultados se expresan como la media de cinco determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **;
P<0,0005 ***

TABLA 11.- Influencia de distintos tiempos de preincubación con fenilpirúvico sobre las actividades enzimáticas PPMVA descarboxilasa, MVA cinasa y PMVA cinasa de cerébro.

10 minutos de preincubación

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	60,20±20,00	139,90±2,00	11,50±0,70	71,70±20,01	211,61±20,11
2,50	65,30±21,30	150,80±1,00	6,05±2,10	71,35±21,4	222,12±21,51
5,00	60,70± 3,10	121,40±3,20	3,68±1,1	64,38± 5,9	185,71± 6,70
10,0	74,30± 7,20	124,50±2,10	1,61±0,8	75,91± 9,9	200,40±10,1

20 minutos de preincubación

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	60,20±20,00	139,90±8,00	11,50±0,71	71,70±20,01	211,60±20,11
2,50	63,80±19,30	153,80±1,00	7,09±1,30	70,89±19,51	224,60±19,61
5,00	71,80±20,30	135,70±3,00	4,03±2,00	75,83±20,90	211,51±21,20
10,0	70,30± 3,20	129,50±4,00	1,90±7,21	72,20± 7,90	201,70± 8,91

Los resultados se expresan como la media de cinco determinaciones ± S.E.M.
F= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **;
P<0,0005 ***

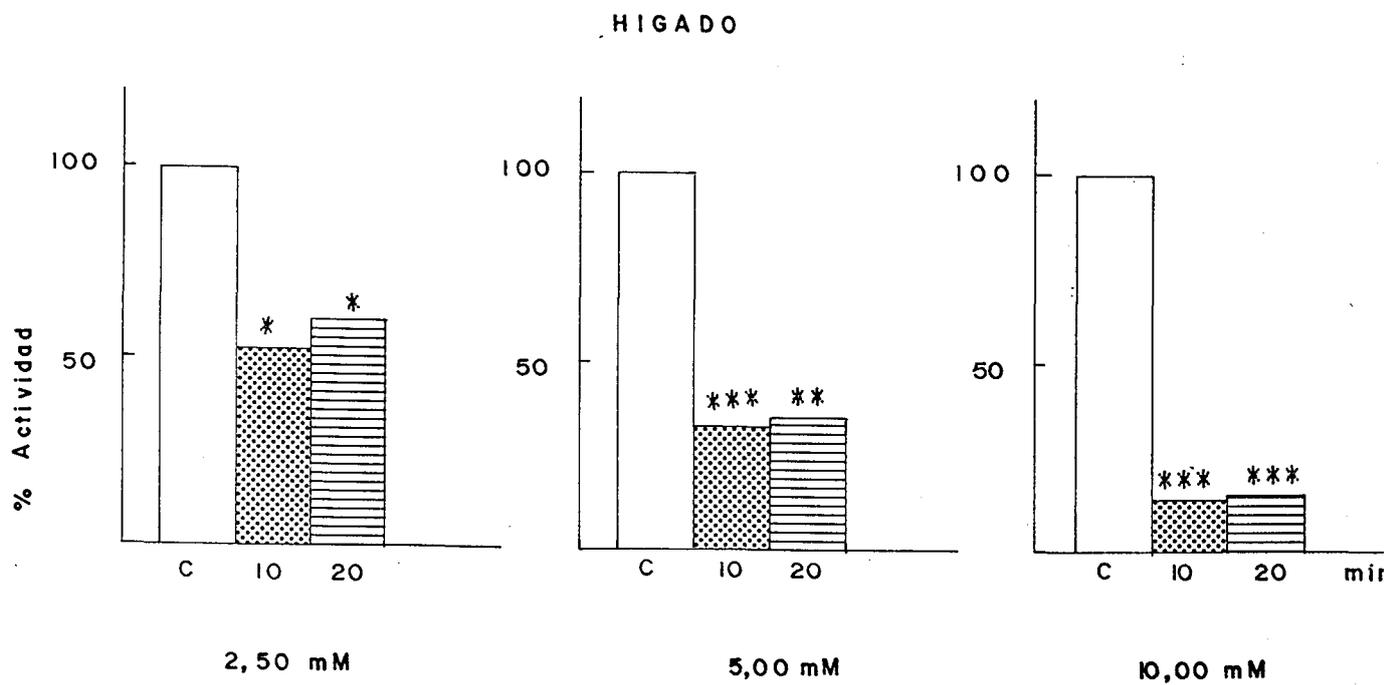
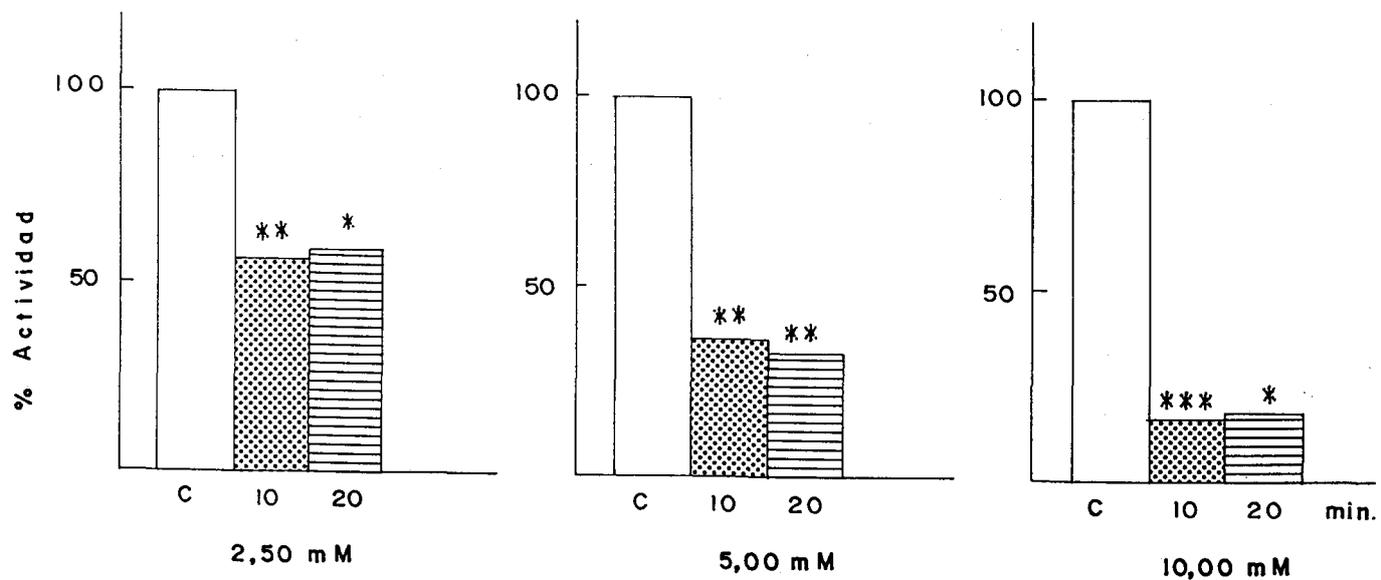


FIG 15.- Influencia de distintos tiempos de preincubación con fenilpirúvico a concentraciones 2,50; 5,00 y 10,00mM sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro

4.C. Efecto "in vitro" de la fenilalanina y algunos de sus metabolitos sobre las actividades PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa.

4.C.1. Efecto de la fenilalanina.

En primer lugar se ha ensayado la posible acción de altas concentraciones de fenilalanina sobre la PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa en hígado y cerebro.

La TABLA 12 (FIG. 16) muestra el efecto producido por concentraciones 1,25, 2,50 y 5,00 mM de fenilalanina sobre las enzimas antes mencionadas. En ellas, se observa que a una concentración de 1,25 mM el efecto sobre las actividades enzimáticas puede considerarse no significativo mientras que a concentraciones superiores (2,50 y 5,00 mM) se aprecia una inhibición significativa y progresiva en la actividad PPMVA descarboxilasa. Las cinasas no parecen afectarse a ninguna concentración de fenilalanina.

En cerebro TABLA 13 (FIG.16) se observa algo similar produciéndose inhibición en la descarboxilasa a partir de una concentración de 2,50 mM.

Comparando los resultados obtenidos para la actividad descarboxilasa en hígado y cerebro, se observa una actuación algo mayor de la fenilalanina a nivel de hígado (FIG.17)

TABLA 12.- Efecto de la fenilalanina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	58,20±9,50	114,20± 8,10	32,80±1,90	91,00± 9,60	205,20±12,61
1,25	52,60±7,00	109,70±16,10	29,30±1,91	81,90± 7,20	191,60±17,61
2,50	51,80±8,90	111,50± 2,60	24,10±0,7	75,90± 8,9	187,40±27,40
5,00	48,60±1,60	96,10± 3,20	21,80±0,4	70,40±16,4	166,50±16,31

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,05 **.

TABLA 13.- Efecto de la fenilalanina a distintas concentraciones sobre la actividad FPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerébro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	FPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	24,10±2,70	72,20±5,50	15,20±0,71	39,30±2,70	111,50±6,10
1,25	26,10±3,60	83,50±9,00	14,20±0,60	40,30±3,61	123,80±9,70
2,50	28,10±5,30	77,30±2,90	12,50±0,61	40,60±5,31	117,90±6,01
5,00	22,80±2,60	86,20±7,30	11,40±0,9 *	34,20±2,70	120,40±7,81

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *

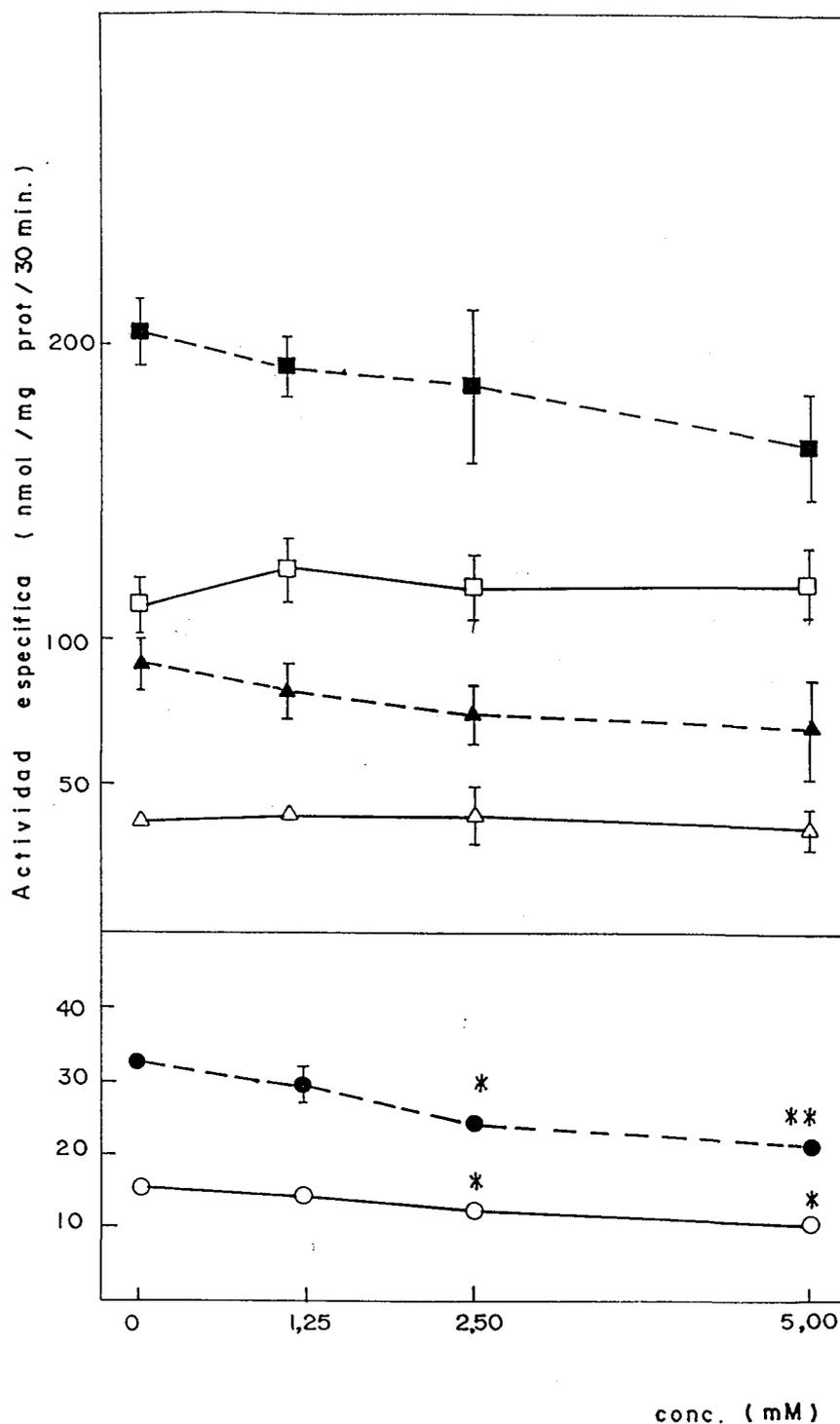


FIG. 16.- Efecto de la fenilalanina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

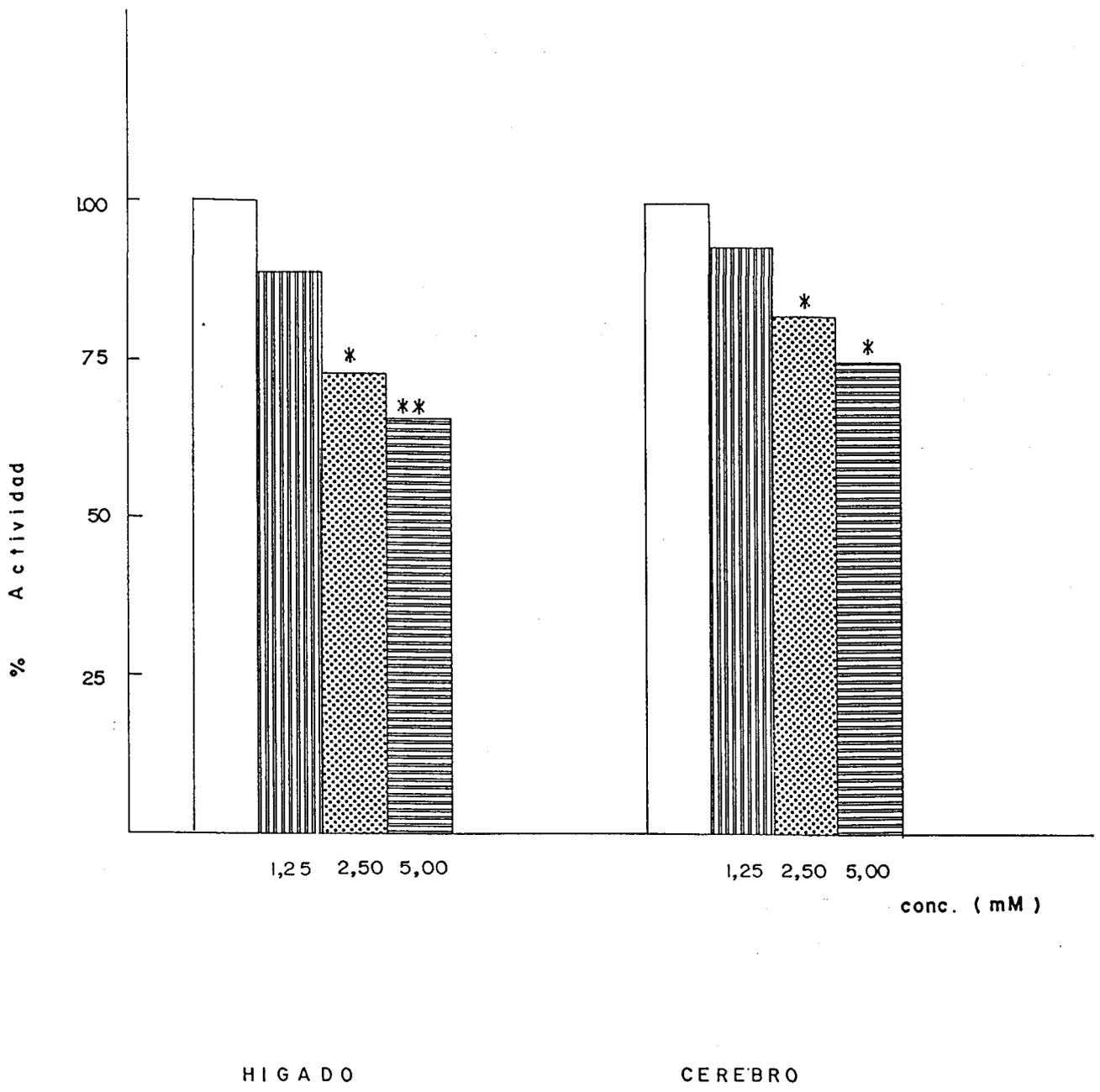


FIG. 17.- Efecto de la fenilalanina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en higado y cerebro.

4.C.2. Efecto del fenilpirúvico.

El efecto del fenilpirúvico a concentraciones 1,25, 2,50 y 5,00 mM sobre las enzimas hepáticas se muestra en la TABLA 14 (FIG. 18). En este caso, aparece una marcada inhibición de la actividad descarboxilasa ya a una concentración de 1,25 mM que progresivamente va aumentando según crece la concentración de metabolito. Las actividades PMVA cinasa y MVA cinasa no se inhiben frente a ninguna concentración de fenilpirúvico ensayada.

EL efecto producido por el fenilpirúvico sobre las enzimas cerebrales se detalla en la TABLA 15 (FIG. 18). Como puede apreciarse a una concentración de 1,25 mM se produce también una marcada inhibición de la actividad descarboxilasa, inhibición que aumenta progresivamente según crece la concentración de fenilpirúvico. Las actividades cinasas no sufren variación significativa a ninguna concentración.

En comparación puede observarse que el efecto inhibitorio ejercido por el fenilpirúvico sobre la actividad descarboxilasa a cualquiera de las concentraciones ensayadas es mayor a nivel de cerebro (FIG. 19).

TABLA 14.- Efecto del fenilpirúvico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	68,10±5,10	142,50± 6,16	31,95±0,80	100,05±5,10	242,00± 8,01
1,25	70,60±5,60	140,10±13,5	19,88±1,10 **	90,48±5,70	230,50±14,61
2,50	60,40±6,20	135,40± 2,20	17,68±1,80 **	78,08±6,41	213,48± 6,80
5,00	67,30±6,40	136,00± 5,40	11,22±0,91 ***	78,52±6,40	214,50± 8,41

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
F= niveles de significación de la t de Student; P<0,005 **; P<0,0005 ***

TABLA 15.- Efecto del fenilpirúvico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerebro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	45,20±10,20	124,40± 5,40	13,90±0,30	59,10±10,30	183,50±11,41
1,25	33,16± 0,75	140,21±22,01	8,61±1,10 **	41,77± 1,31	181,90±22,01
2,50	48,61± 0,50	111,64± 8,60	7,20±1,00 **	55,81± 1,10	167,40± 8,61
5,00	47,11± 0,64	119,51± 1,30	4,07±0,60 ***	51,18± 0,71	170,60± 1,51

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,005 **; P<0,0005 ***

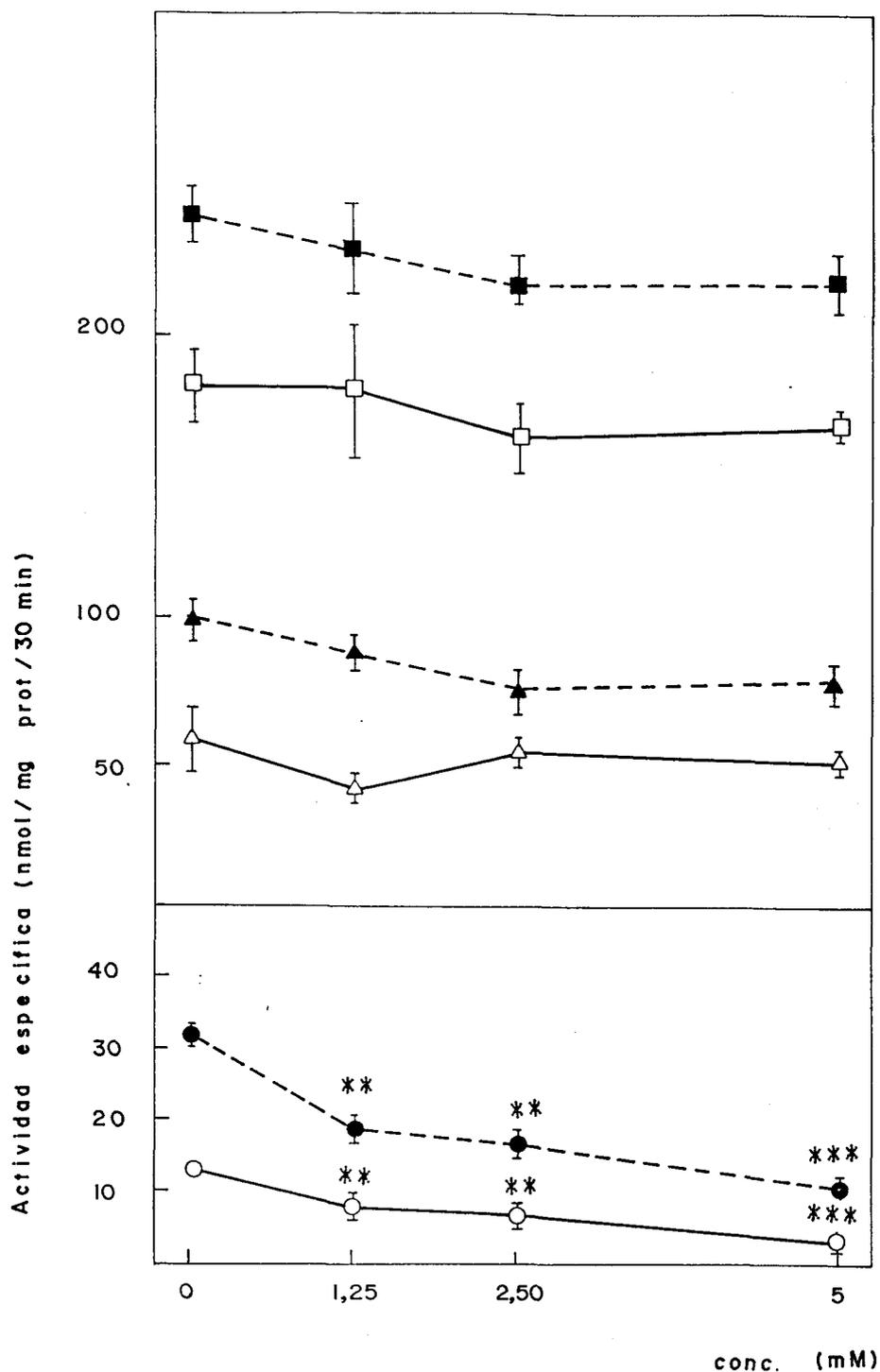


FIG. 18.- Efecto del fenilpirúvico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (○); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

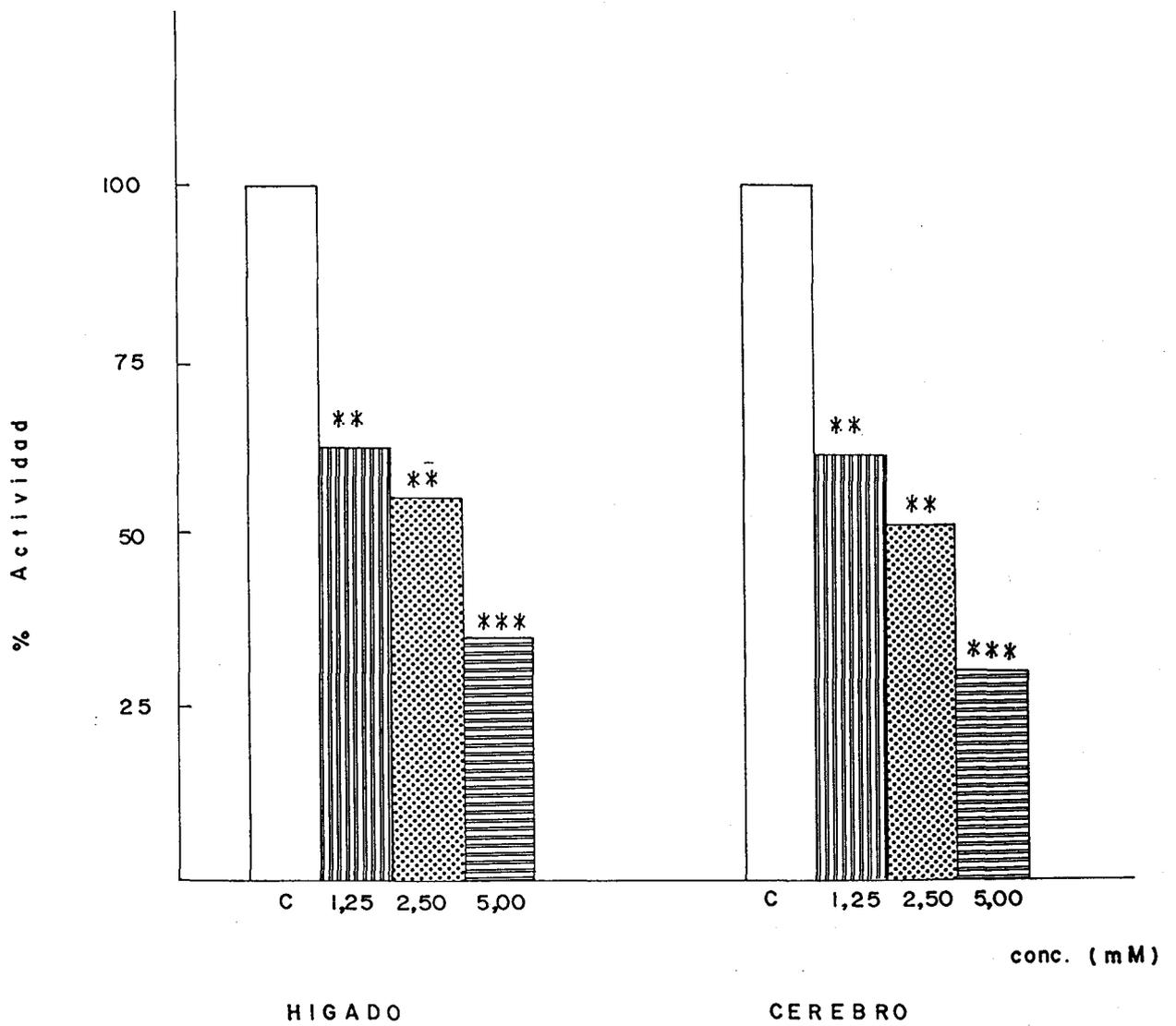


FIG. 19.- Efecto del fenilpirúvico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro.

4.C.3. Efecto del fenilacético.

El ácido fenilacético también produce una marcada inhibición en la actividad descarboxilasa, tanto en hígado como en cerebro. El efecto sobre las enzimas hepáticas se muestra en la TABLA 16 (FIG. 20) en la cual se puede apreciar que a cualquier concentración (1,25-5,00 mM) se produce una disminución significativa de la actividad descarboxilasa mientras que las cinasas no se afectan.

La TABLA 17 (FIG. 20) pone de manifiesto la inhibición producida por el fenilacético sobre la descarboxilasa de cerebro sin modificarse a ninguna concentración las actividades cinasas.

Al igual que en el caso anterior, el efecto inhibitor sobre la descarboxilasa es mayor en el caso del cerebro a cualquier concentración (FIG. 21)

4.C.4. Efecto del fenilactico.

La TABLA 18 (FIG. 22 y 23) muestra los resultados obtenidos con el fenilactico a concentraciones crecientes sobre las actividades enzimáticas en hígado. Como puede apreciarse, a ninguna de estas concentraciones el fenilactico produce una variación significativa de la actividad descarboxilasa de hígado. Las actividades cinasas tampoco sufren inhibición significativa.

En cerebro según muestra la TABLA 19 (FIG. 22 y 23) a concentración 1,25 mM de fenilactico tampoco se produce una inhibición significativa de la descarboxilasa; sin embargo a concentración 2,50 y 5,00 mM sí se ejerce un efecto inhibitor sobre esta enzima de cerebro.

TABLA 16.- Efecto del fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	46,03±2,70	98,20±5,80	39,46±1,40	85,49±1,40	183,60±6,51
1,25	52,30±3,06	105,78±6,20	32,72±1,80	85,02±3,59	190,80±7,11
2,50	53,50±3,04	107,86±1,08	29,82±1,81	83,32±3,21	191,10±3,31
5,00	45,40±5,36	97,83±3,40	28,34±0,42	73,74±5,30	171,60±6,32

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

TABLA 17.- Efecto del fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerébro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	23,44±1,24	93,91±2,37	15,35±0,10	38,79±1,20	132,70±2,60
1,25	20,79±1,00	92,54±1,00	12,43±0,51 **	33,22±1,11	125,76±1,50
2,50	18,15±0,30	86,74±0,90	11,16±0,11 ***	29,31±0,30	116,05±0,90
5,00	14,06±0,42	86,13±3,50	6,35±0,80 ***	20,41±0,91	106,51±3,61

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
 P= niveles de significación de la t de Student; P<0,005 **
 P<0,0005 ***

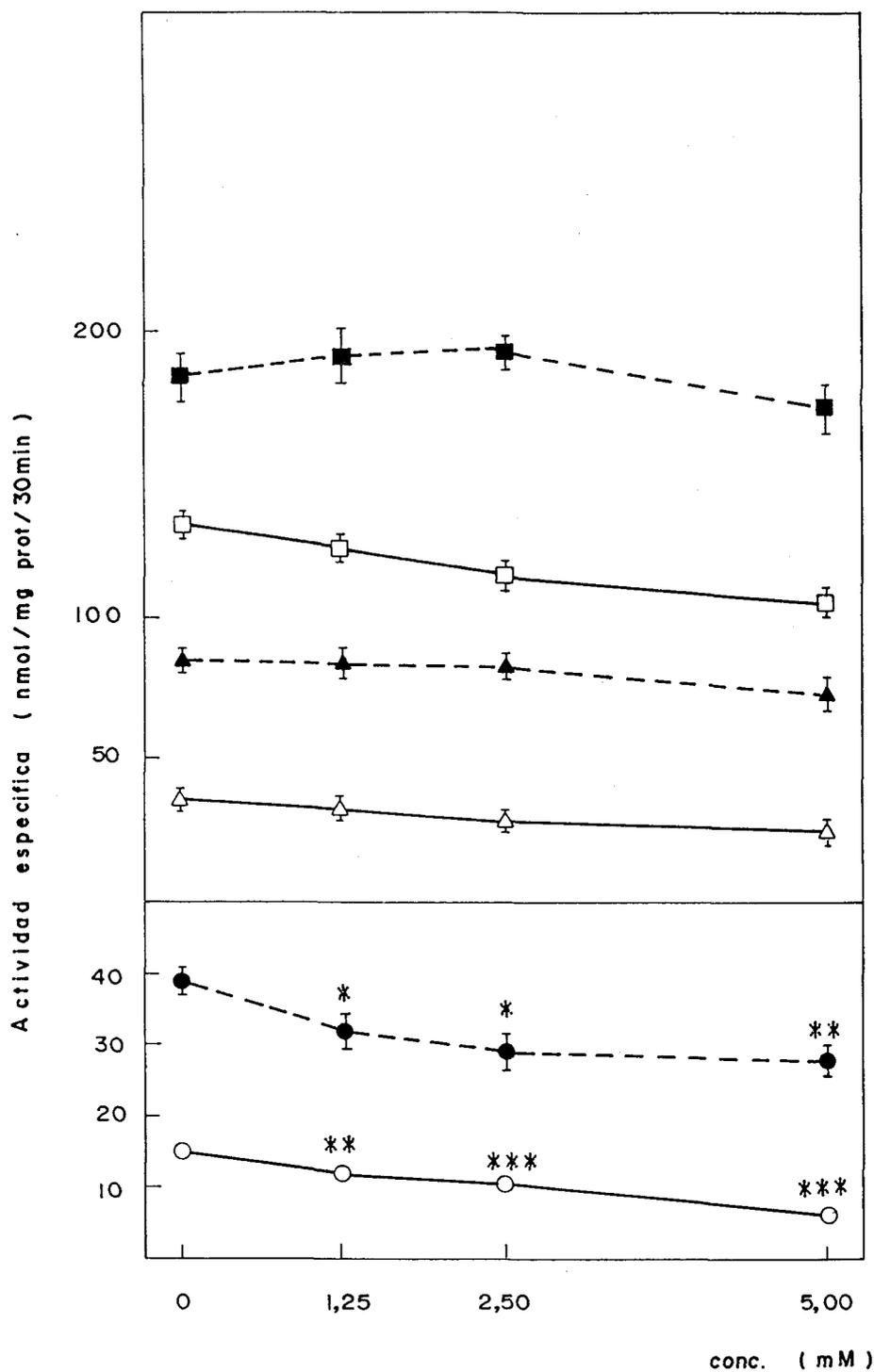


FIG. 20.- Efecto del fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa FMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad FMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

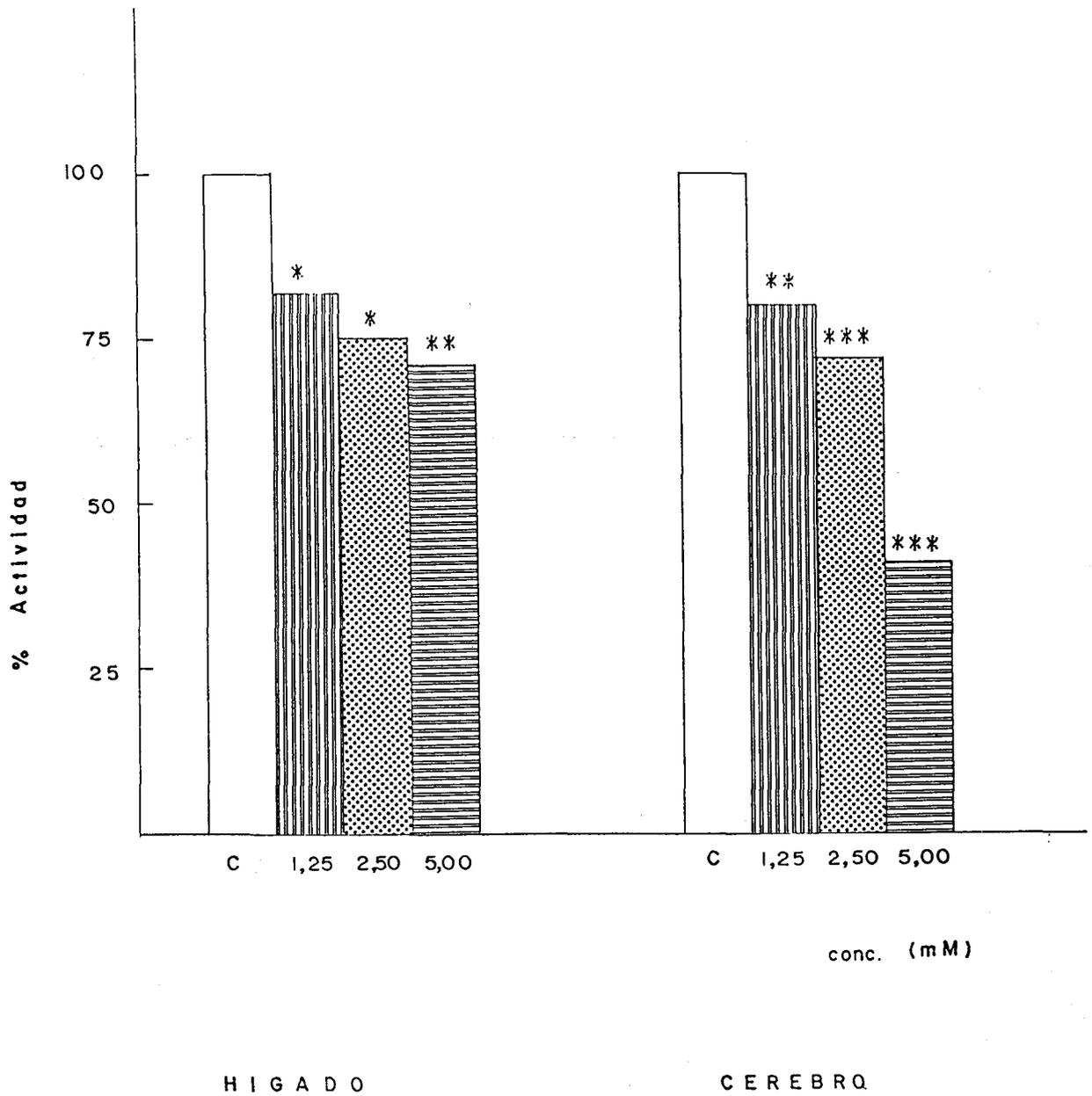


FIG. 21.- Efecto del fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro.

TABLA 18.- Efecto del fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	46,03±2,70	98,20±5,00	39,70±1,60	85,50±3,10	183,70±5,91
1,25	49,72±1,48	103,00±5,50	38,11±0,81	87,83±1,71	191,50±5,71
2,50	41,94±3,80	103,05±1,96	36,94±0,92	78,88±3,91	181,90±4,41
5,00	44,23±2,85	106,20±6,05	34,31±1,10	78,54±3,02	184,70±6,81

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.

TABLA 19.- Efecto del fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerebro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	24,52±3,33	98,98±3,42	14,14±0,21	38,66±3,30	137,60±4,80
1,25	19,22±1,03	96,09±3,06	11,12±1,83	30,34±2,12	126,41±3,71
2,50	22,40±2,39	89,07±5,57	8,01±0,30 ***	30,41±2,41	119,41±6,12
5,00	19,20±5,00	95,69±1,16	7,08±0,21 ***	26,28±5,02	121,90±6,81

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
 P= niveles de significación de la t de Student; P<0,0005 ***

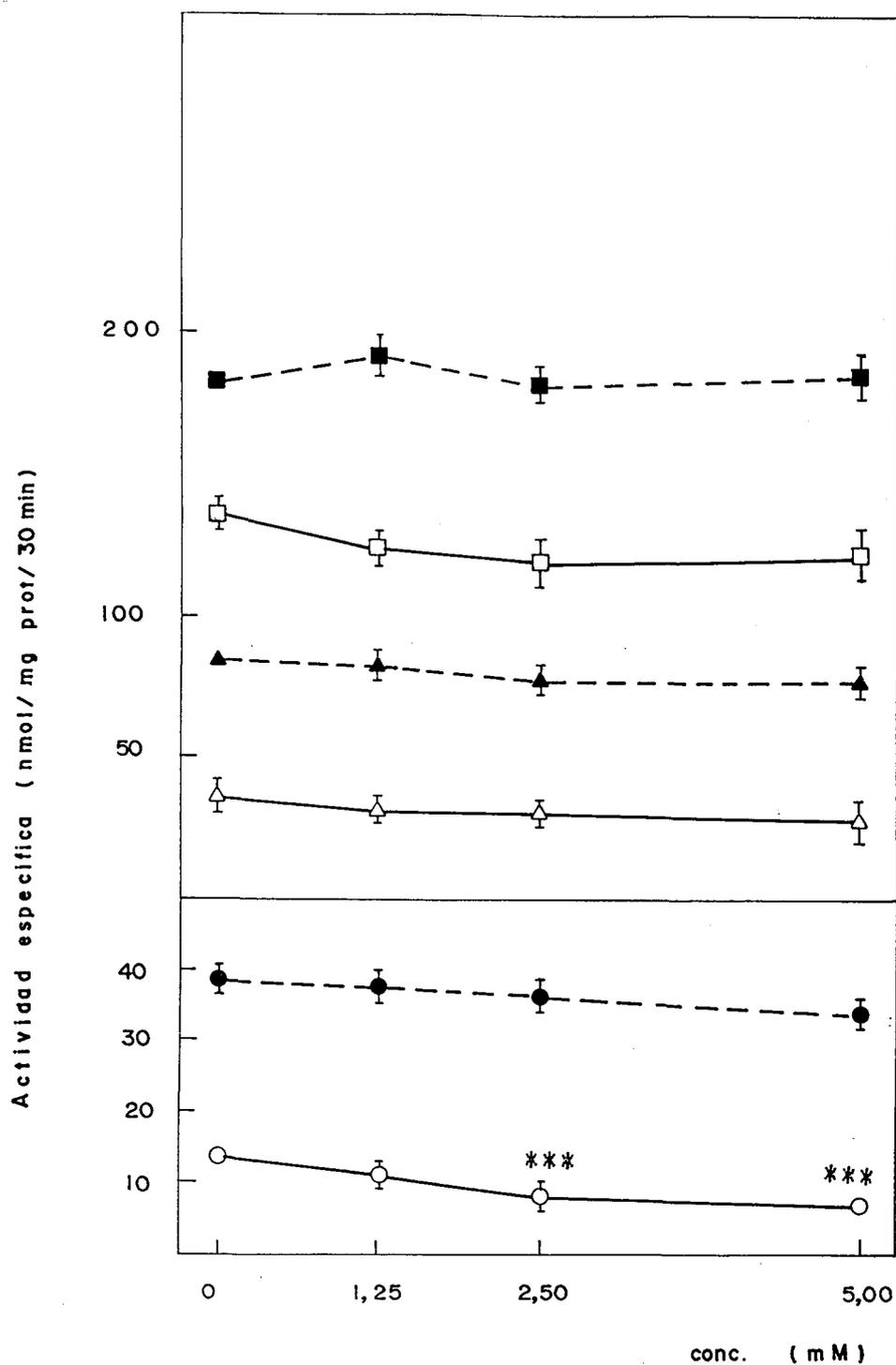


FIG. 22.- Efecto del fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

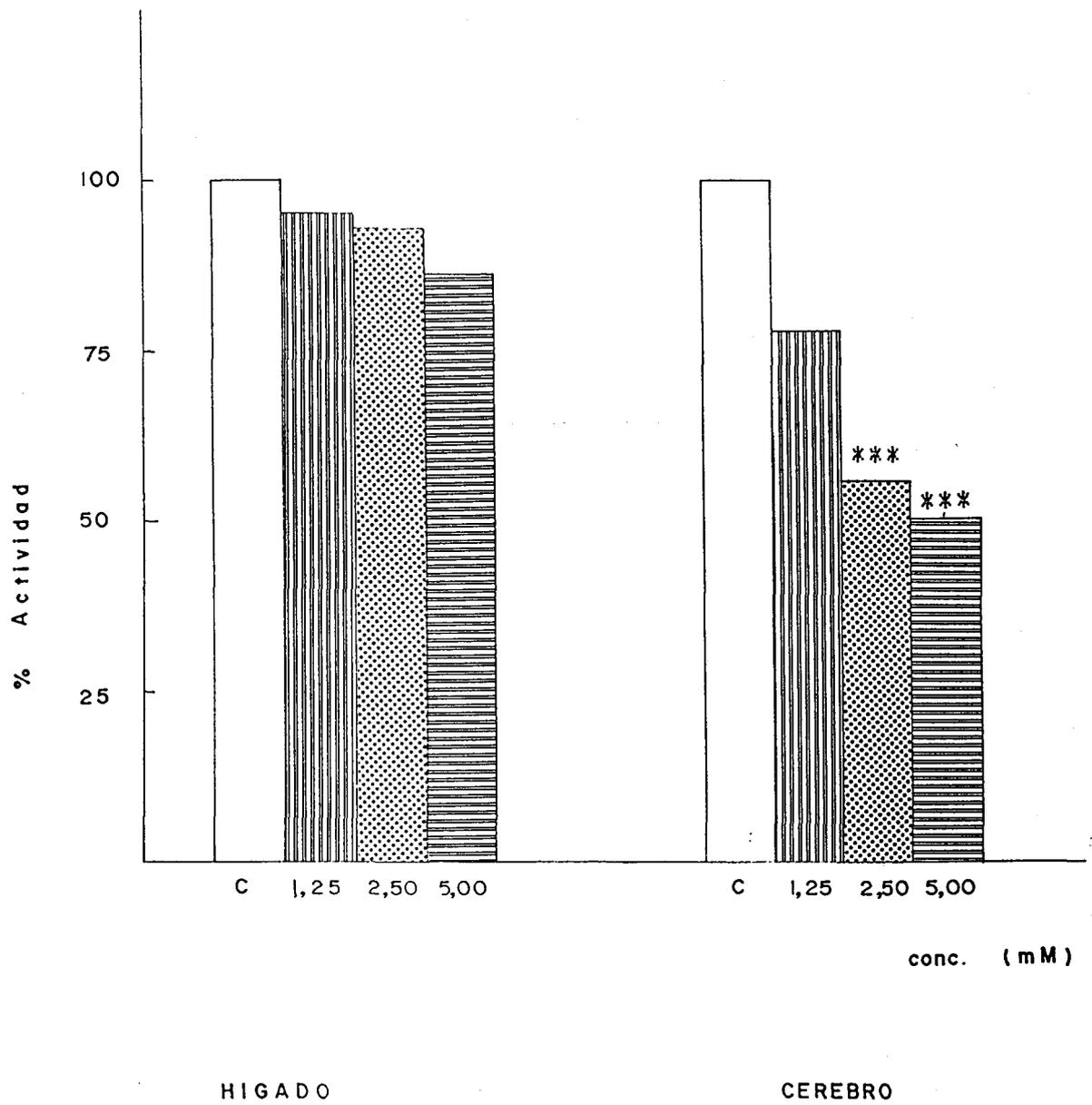


FIG. 23.- Efecto del fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en higado y cerebro.

4.C.5. Efecto del o-hidroxi-fenilacético.

Considerando los resultados expresados en la TABLA 20 (FIG. 24 y 25) el o-hidroxi-fenilacético solo ejerce significativamente un efecto inhibitor de la actividad descarboxilasa de hígado a una concentración de 5,00 mM. En cerebro, ya a la concentración menor ensayada, se produce una inhibición significativa que va creciendo segun aumenta la concentración de metabolito TABLA 21 (FIG.24 y 25)

Por otra parte el o-hidroxi-fenilacético tampoco ejerce ninguna acción sobre las cinasas de hígado ni de cerebro.

4.C.6. Efecto del p-hidroxi-fenilacético.

El p-hidroxi-fenilacético según se muestra en la TABLA 22 (FIG. 26 y 27), solo ejerce inhibición de la actividad descarboxilasa de hígado a concentración 2,50 y 5,00 mM. En cerebro sin embargo este efecto sí se ejerce a cualquier concentración probada, TABLA 23 (FIG. 26 y 27). Las cinasas en el caso del hígado y del cerebro no parecen afectarse a ninguna concentración probada.

TABLA 20.- Efecto del o-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	49,12±6,88	119,01±12,60	34,39±1,30	83,51±7,01	202,50±14,41
1,25	56,99±6,81	110,34± 5,55	34,23±1,61	91,22±7,02	201,56± 8,93
2,50	51,66±5,23	122,57± 4,45	27,89±2,71	79,55±5,90	202,10± 7,42
5,00	50,36±5,15	117,27± 3,95	22,90±0,73 ***	73,26±5,21	190,51± 6,51

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones±S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,0005***

TABLA 21.- Efecto del o-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerebro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	33,53±4,30	104,65±4,46	15,92±0,30	49,45±4,30	154,11±6,22
1,25	33,15±1,50	96,32±4,76	12,84±0,43 **	45,99±1,52	142,31±5,02
2,50	29,20±4,50	104,97±2,12	10,10±0,32 ***	39,30±4,53	144,31±4,92
5,00	33,50±2,94	106,42±4,59	6,40±0,31 ***	39,90±2,92	136,30±5,42

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones±S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,005** ; P<0,0005***

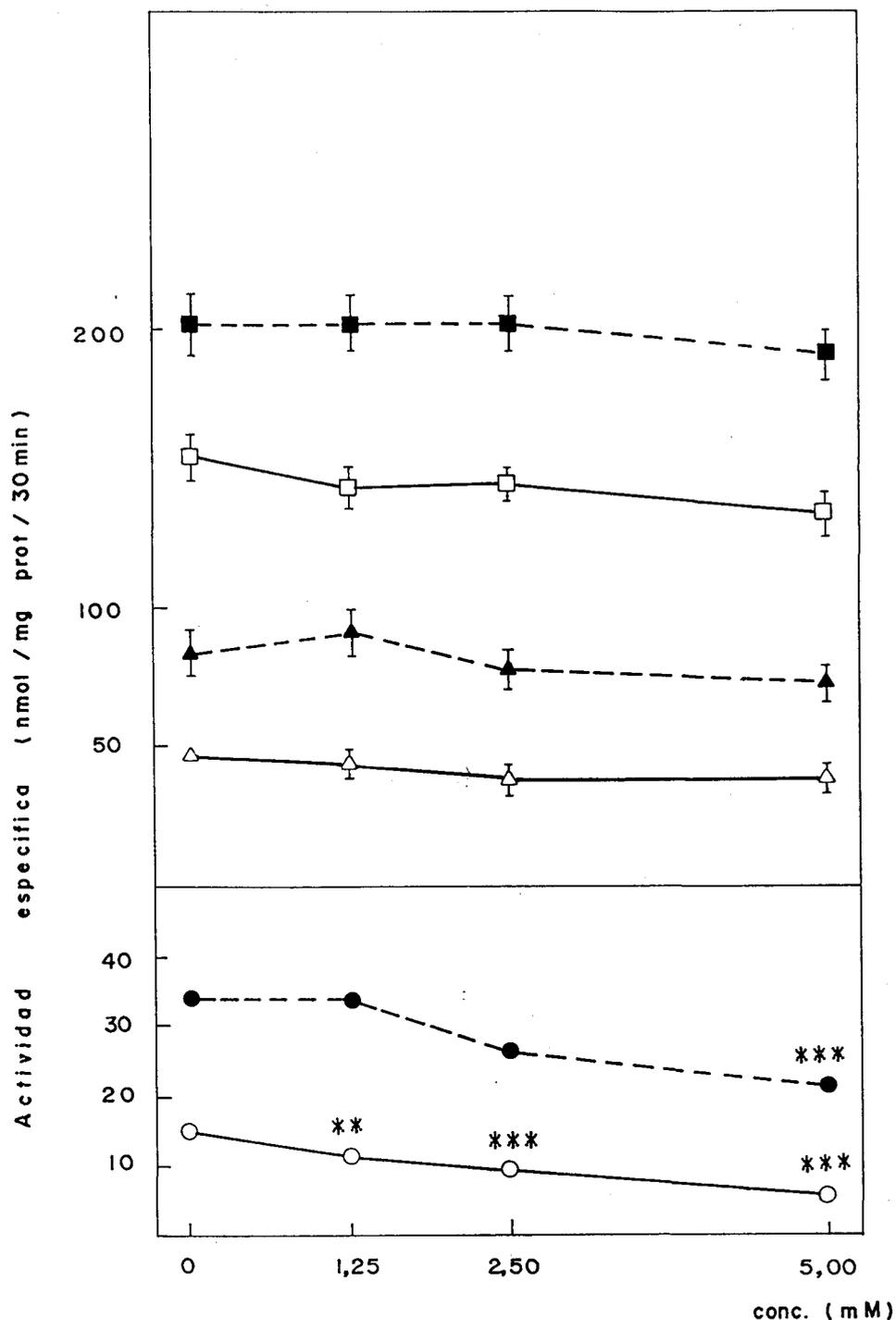


FIG. 24.- Efecto del o-hidroxi-fenilacético a distintas concen- traciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

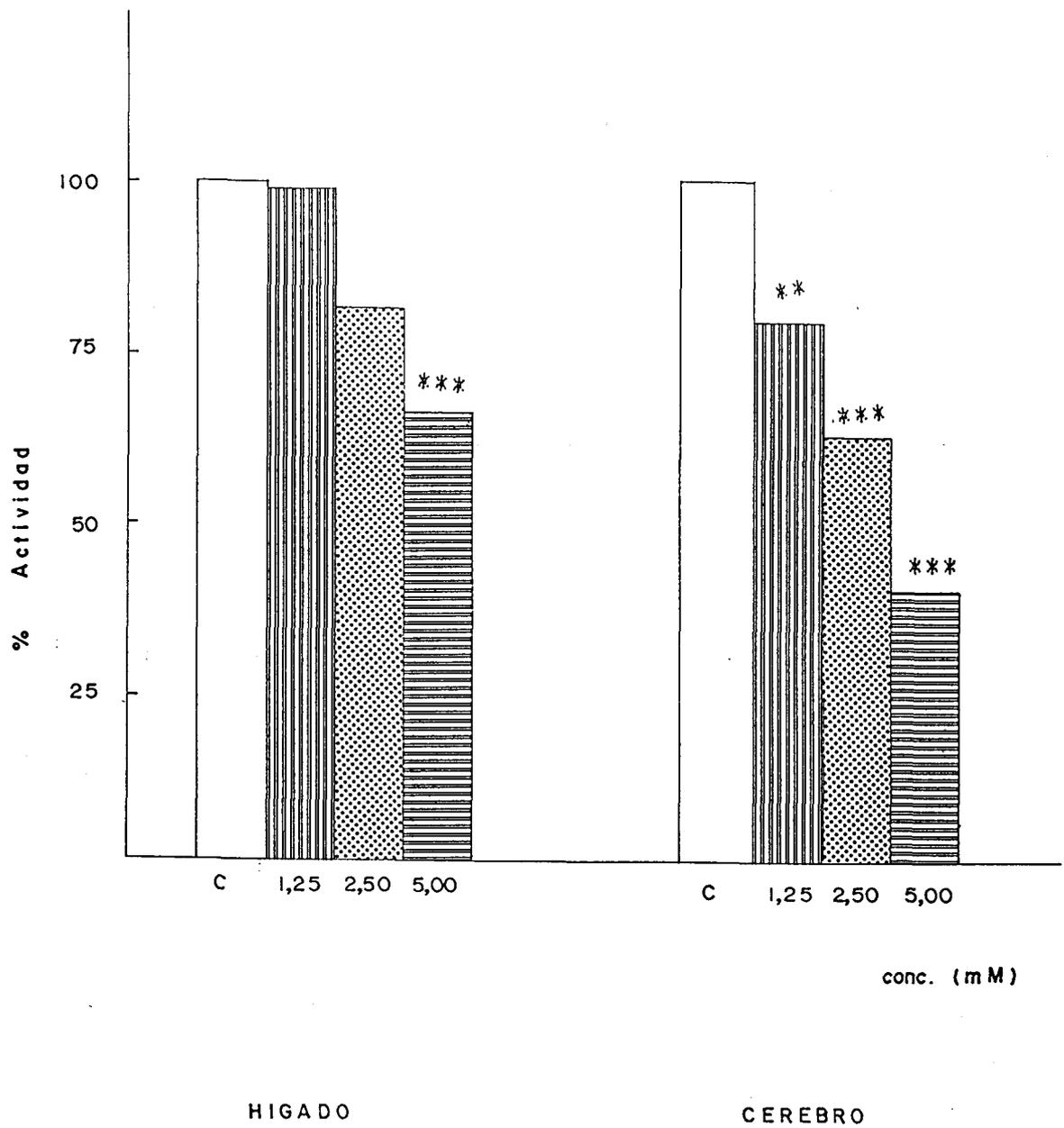


FIG. 25.- Efecto del o-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en higado y cerebro.

TABLA 22.- Efecto del p-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	64,65±5,30	116,39±5,10	34,91±0,71	99,56±5,32	215,91±7,42
1,25	53,91±0,70	140,90±8,30	34,76±1,01	88,67±1,23	229,52±8,31
2,50	48,31±2,50	135,50±1,08	29,16±0,21	77,42±2,52	212,97±2,73
5,00	52,41±4,06	140,20±3,00	27,53±0,51 **	79,94±4,01	210,14±5,02

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,005 **

TABLA 23.- Efecto del p-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerébro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	35,30±10,10	117,10±19,80	14,04±0,71	49,34±10,11	166,42±22,21
1,25	31,98± 6,01	105,60± 3,80	10,14±0,32 **	42,12± 5,52	147,72± 6,71
2,50	37,54± 5,55	89,57± 3,80	8,50±1,41 *	46,04± 5,71	135,62± 6,81
5,00	36,60± 7,06	93,50± 4,20	7,88±0,32 **	44,48± 7,10	137,91± 8,23

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

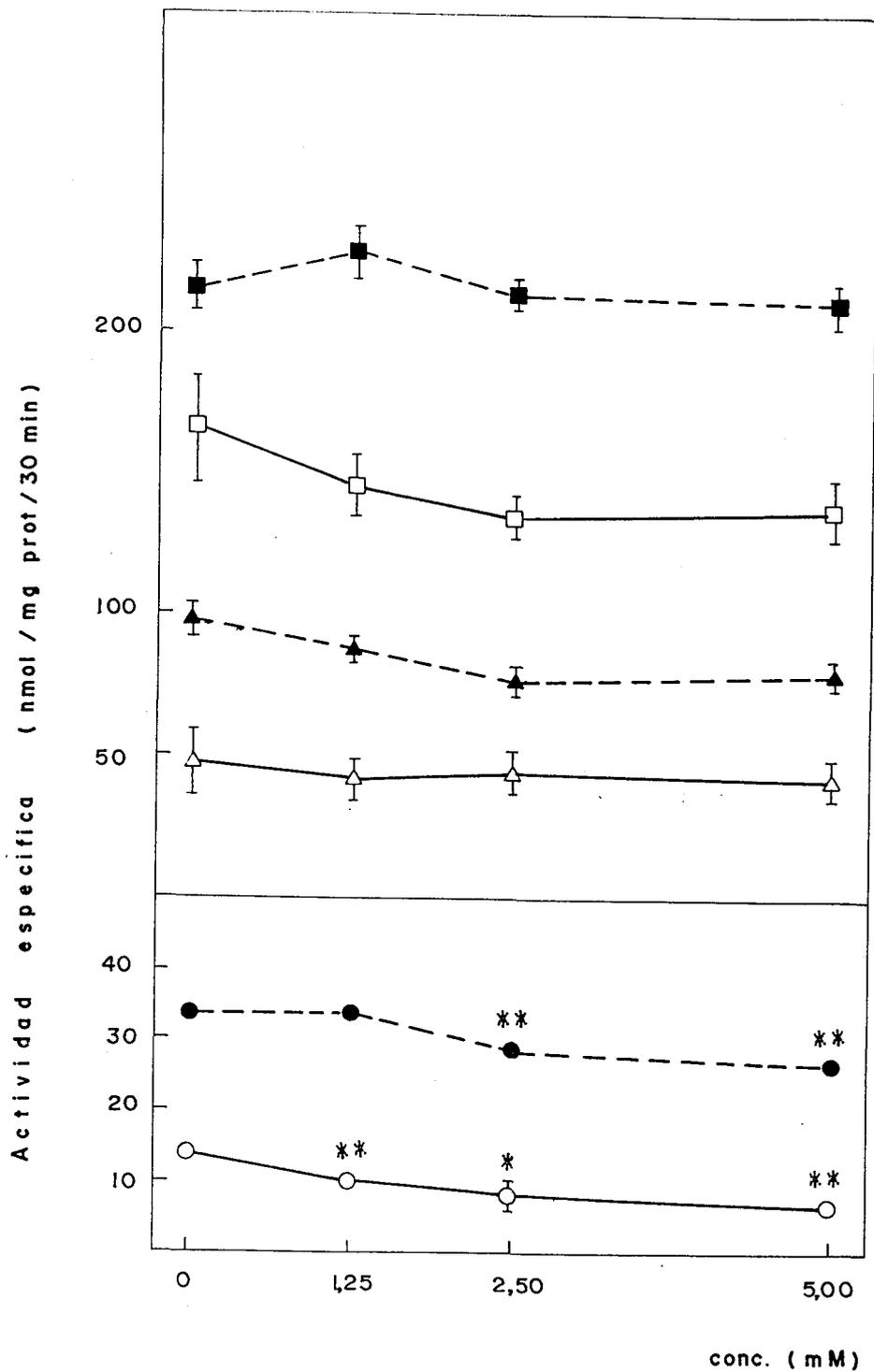


FIG. 26.- Efecto del p-hidroxi-fenilacético a distintas concen- traciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (□). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

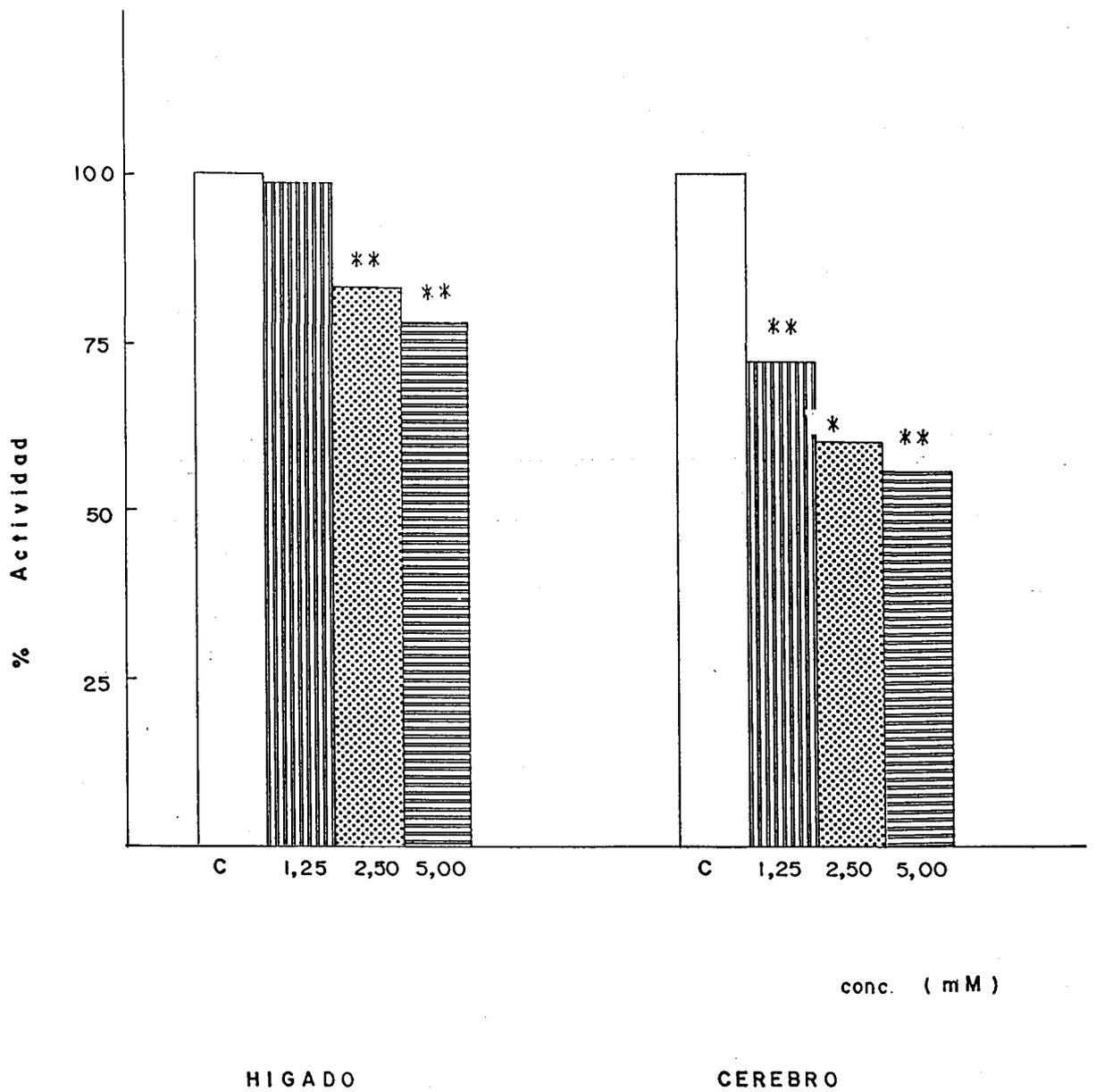


FIG. 27.- Efecto del p-hidroxi-fenilacético a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en higado y cerebro.

4.C.7. Efecto del p-hidroxi-fenilactico.

Este metabolito a cualquier concentración (1,25-5,00 mM) produce una inhibición significativa de la actividad descarboxilasa de hígado y cerebro segun se deduce de las TABLAS 24 y 25 (FIG. 28 y 29). Las cinasas en ningun caso parecen modificar su actividad.

4.C.8. Efecto de la feniletilamina.

Segun se deduce de la TABLA 26 (FIG.30 y 31) la feniletilamina no produce ningun efecto significativo sobre la enzima descarboxilasa hepática asi como tampoco de las cinasas.

En cerebro (TABLA 27) (FIG. 30 y 31) a un concentración 1,25 mM tampoco se produce una inhibición significativa mientras que a 2,50 y 5,00 mM si se produce un efecto inhibitor considerable sobre la actividad descarboxilasa. Como en los casos anteriores, sobre las actividades MVA cinasa y PMVA cinasa no se produce ningun efecto por las distintas concentraciones de metabolito.

TABLA 24.- Efecto del p-hidroxi-fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, FMVA cinasa y MVA cinasa de higado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	FMVA	PPMVA desc.	FMVA cinasa	MVA cinasa
---	68,01± 8,09	136,98± 7,60	34,88±0,81	102,89± 8,12	239,80±11,12
1,25	52,18± 5,01	141,93± 6,01	28,39±2,12 *	80,57± 5,43	222,51± 8,01
2,50	59,41± 6,01	132,31± 5,01	25,83±0,81 **	85,24± 6,12	217,51± 7,82
5,00	62,25±10,70	126,08±16,00	23,42±1,52 **	85,67±10,8	211,72±19,31

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student ; P<0,05 *; P<0,005 **;

TABLA 25.- Efecto del p-hidroxi-fenilactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, FMVA cinasa y MVA cinasa de cerébro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	FMVA cinasa	MVA cinasa
---	33,82±9,80	103,28±15,50	15,07±0,31	48,89±9,81	152,21±18,30
1,25	19,26±0,50	115,05± 5,50	12,44±0,12 **	31,70±0,52	146,71± 5,52
2,50	19,43±0,50	108,90± 0,01	6,87±0,01 **	26,80±0,52	135,20± 0,52
5,00	25,80±1,30	111,07± 8,20	4,56±0,11 **	30,36±1,34	141,42± 8,32

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student ; P<0,005 **; P<0,0005 ***;

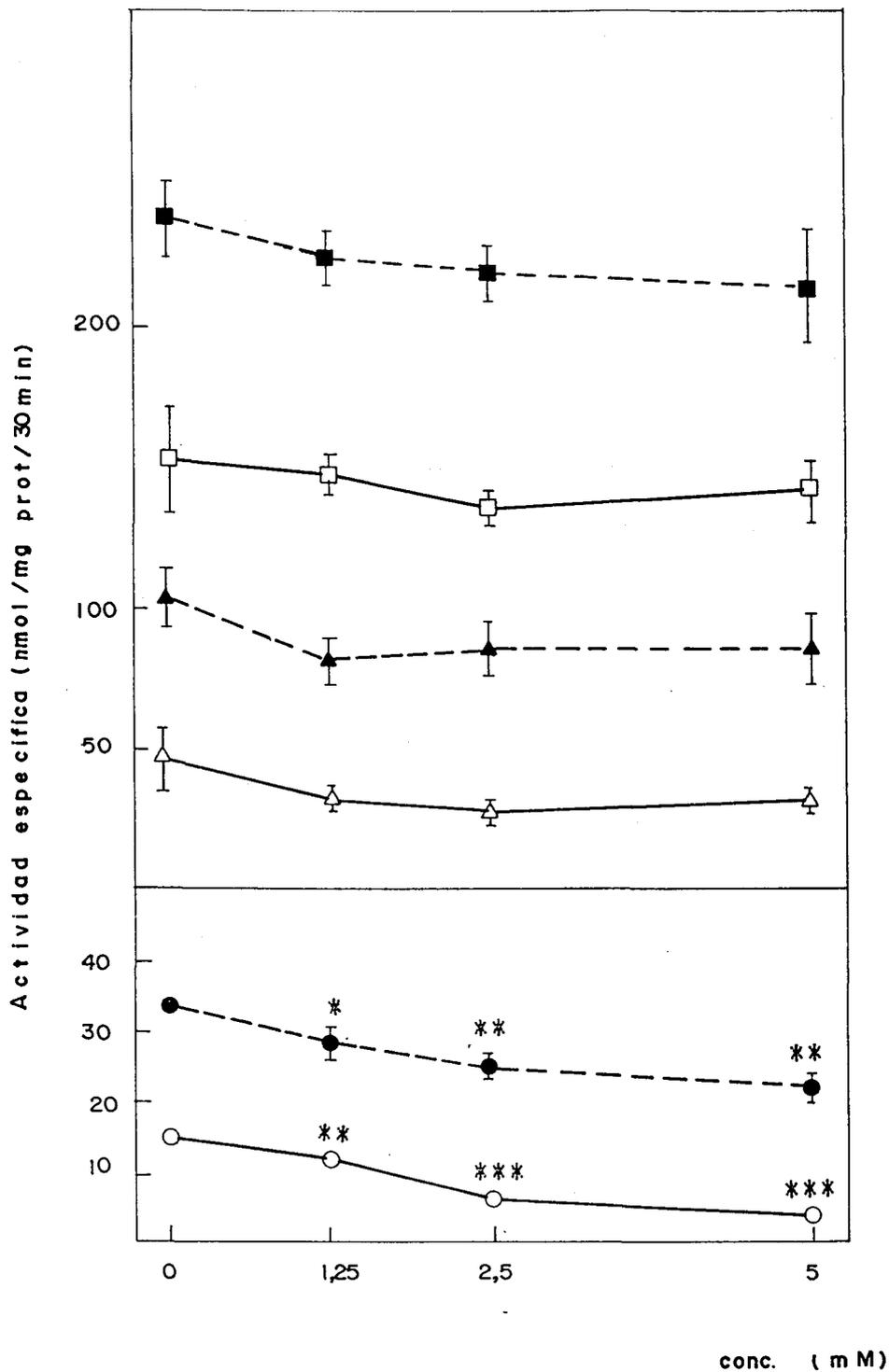


FIG. 28.- Efecto del p-hidroxi-fenillactico a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de higado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (\square). Lineas continuas corresponden a cerebro y lineas discontinuas a higado. Las lineas verticales representan el error estándar de la media.

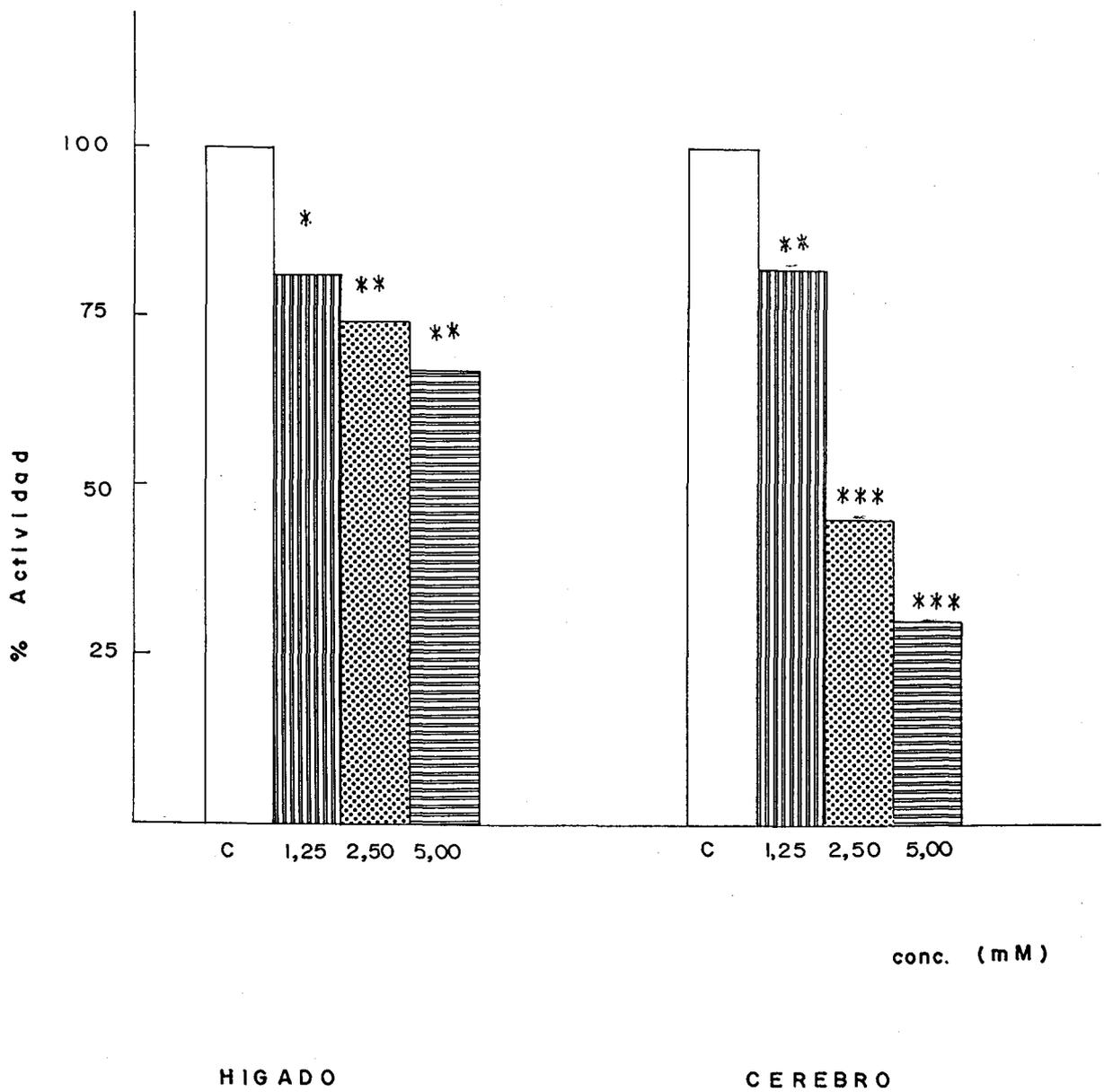


FIG. 29.- Efecto del p-hidroxi-fenilactico a distintas concen- traciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en higado y cerebro.

TABLA 26.- Efecto de la feniletilamina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	85,40±20,80	113,66±14,30	35,89±3,12	121,29±21,01	234,91±25,40
1,25	81,74± 9,40	116,36± 3,90	36,96±0,71	118,70± 9,41	235,02±10,21
2,50	84,51±19,60	117,89±16,97	34,69±6,81	119,96±19,61	230,81±25,92
5,00	83,74± 8,09	119,60±12,13	29,20±1,31	112,68± 8,2	232,54±14,60

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.

TABLA 27.- Efecto de la feniletilamina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de cerébro.

Concen- tración (mM)	Derivados fosforilados (nmol/ 30 min/mg prot.)		Actividad enzimática (nmol/ 30 min/mg prot.)		
	PPMVA	PMVA	PPMVA desc.	PMVA cinasa	MVA cinasa
---	24,07±2,70	72,22±5,50	13,07±0,72	37,14±2,72	109,32± 6,11
1,25	22,30±1,50	73,50±3,40	11,11±0,52	33,41±1,61	106,92± 3,71
2,50	23,57±5,90	77,12±9,15	10,75±0,51	34,32±5,92	111,40±10,92
5,00	26,55±2,60	72,55±3,07	* 9,99±0,62 *	36,54±2,72	109,09± 4,01

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *

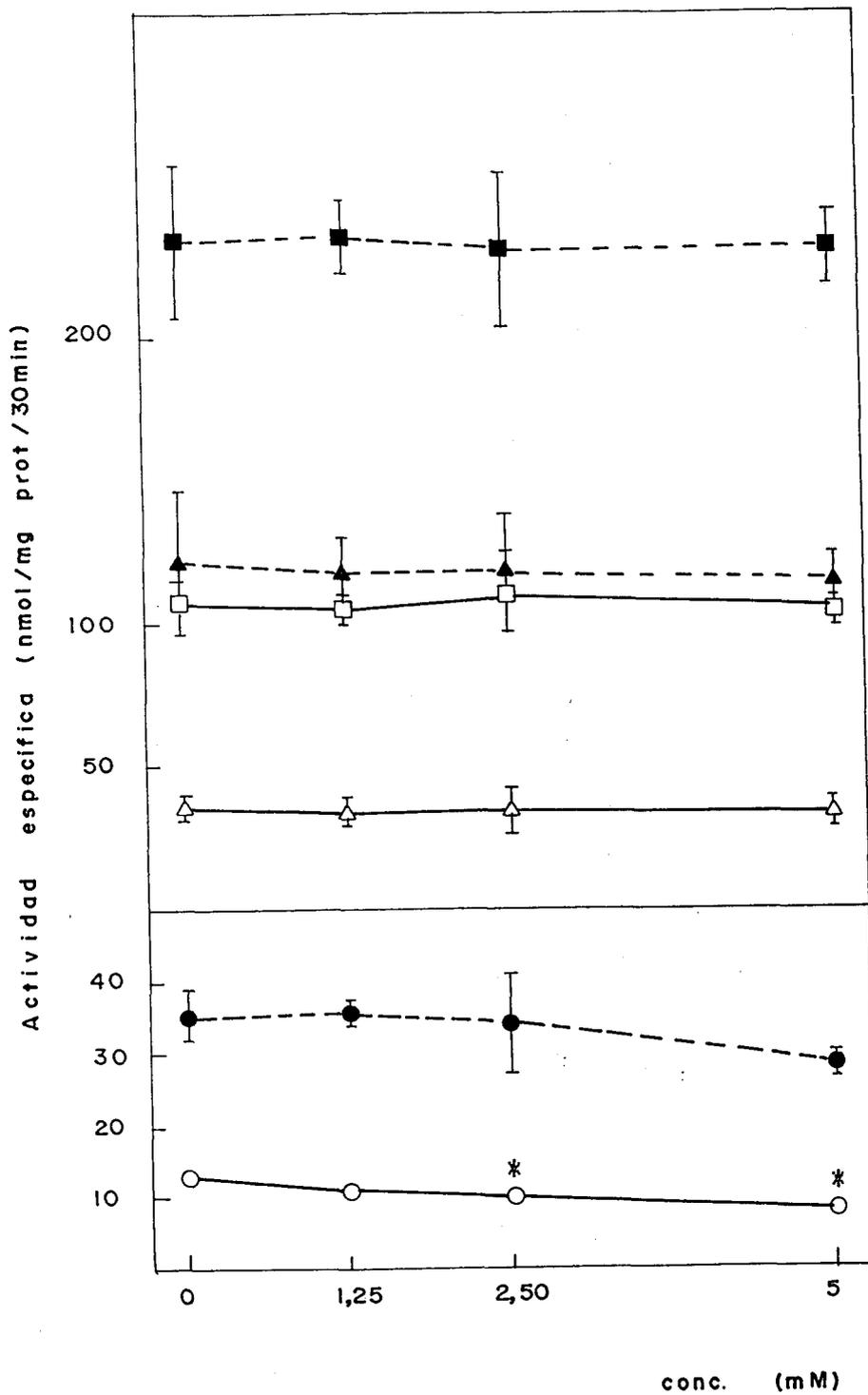


FIG. 30.- Efecto de la feniletilamina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa, PMVA cinasa y MVA cinasa de hígado y cerebro. Actividad PPMVA descarboxilasa (O); actividad PMVA cinasa (Δ); actividad MVA cinasa (\square). Líneas continuas corresponden a cerebro y líneas discontinuas a hígado. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

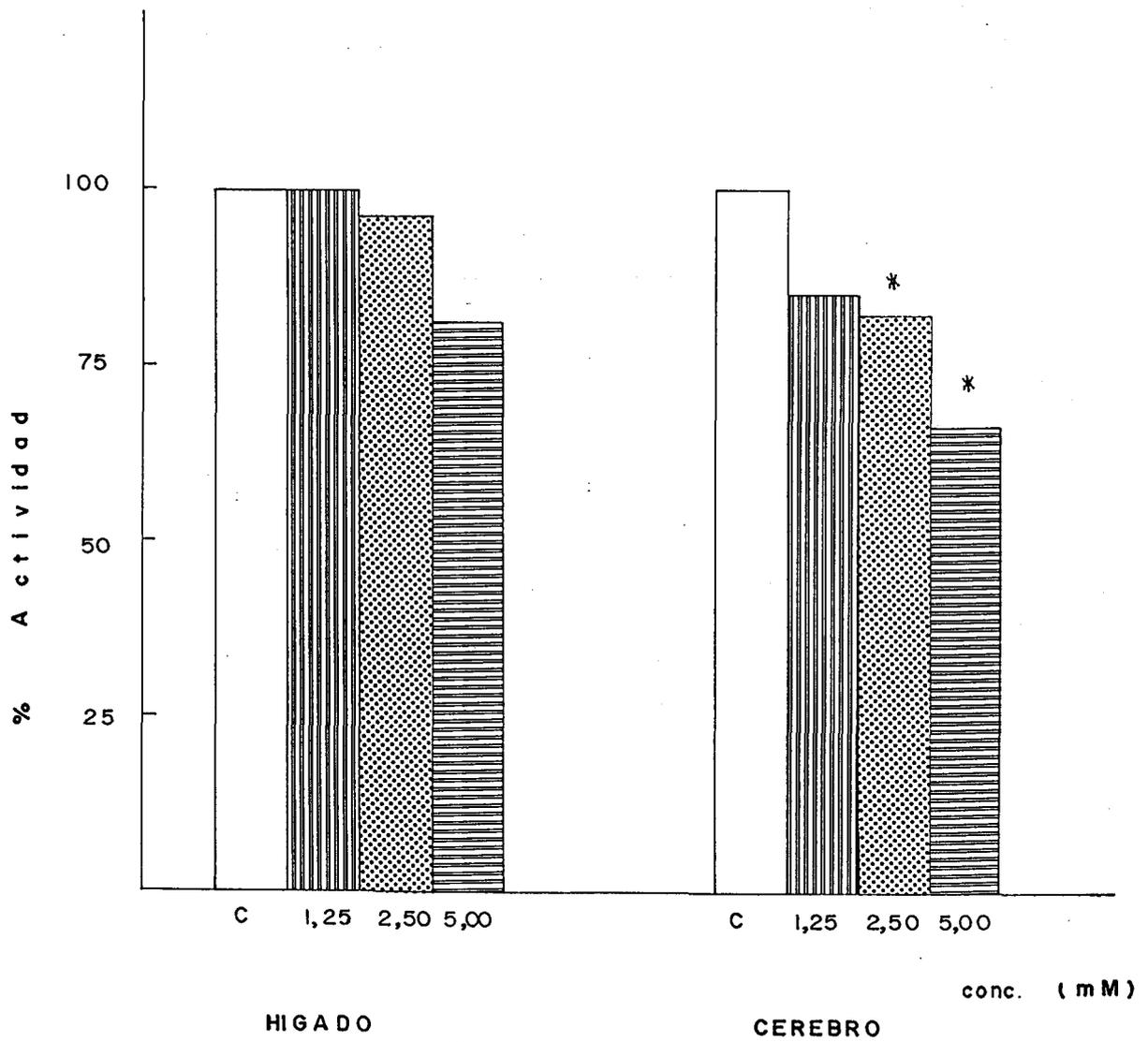


FIG. 31.- Efecto de la feniletilamina a distintas concentraciones sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro.

4.C.9. Estudio comparativo del efecto producido por la fenilalanina y los metabolitos ensayados.

En la TABLA 28 se exponen los tantos por ciento de actividad descarboxilasa de hígado y cerebro observada tras el tratamiento con fenilalanina y sus metabolitos.

Como puede apreciarse a excepción de la fenilalanina que produce mayor efecto inhibitor a nivel de hígado, el resto de los metabolitos es a nivel de cerebro donde producen una mayor acción.

Por otro lado, de entre los distintos metabolitos probados, destaca por su mayor efecto inhibitor el ácido fenilpirúvico seguido del p-hidroxi fenilactico y fenilacético

El fenilactico y la feniletilamina a ninguna concentración de las ensayadas producen efecto significativo sobre la descarboxilasa hepática.

TABLA 28.- Tanto por ciento de actividad de la PPMVA descarboxilasa por fenilalanina y distintos metabolitos a diferentes concentraciones

compuesto	concentración	Hígado	Cerebro
Fenilalanina	1,25	89,00%	93,00%
	2,50	73,47% *	82,30% *
	5,00	66,50% **	75,00% *
Fenilpirúvico	1,25	62,20% **	62,00% **
	2,50	55,30% **	51,50% **
	5,00	35,10% ***	29,10% ***
Fenilacético	1,25	82,00% *	80,00% **
	2,50	75,00% *	73,00% ***
	5,00	71,00% **	41,00% ***
Fenilactico	1,25	95,00%	78,00%
	2,50	93,0%	56,00% ***
	5,00	87,00%	50,00% ***
o-hidroxi-fenilacético	1,25	99,99%	90,00% **
	2,50	81,00%	63,00% ***
	5,00	66,00% ***	40,00% ***
p-hidroxi-fenilacético	1,25	99,99%	72,20% **
	2,50	83,50% **	60,50% *
	5,00	78,80% **	56,15% **
p-hidroxi-fenilactico	1,25	81,20% *	82,50% **
	2,50	73,90% **	46,00% ***
	5,00	67,00% **	30,00% ***
Feniletilamina	1,25	99,90%	85,00%
	2,50	96,0%	82,00% *
	5,00	81,0%	76,00% *

4.D. Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos sobre la actividad PPMVA descarboxilasa de hígado y de cerebro.

Una vez considerado el papel inhibitor ejercido por la fenilalanina y por los distintos metabolitos probados sobre la actividad descarboxilasa, y observando que la actividad MVA cinasa y PMVA cinasa no varían en ningún caso y a ninguna concentración ensayada, pasamos a determinar exclusivamente la actividad descarboxilasa. Con una mezcla de todos los metabolitos ensayados y de fenilalanina, cada uno a concentración 0,25 mM se realizó la siguiente experiencia. La TABLA 29 (FIG. 32) muestra como a esta concentración, por otra parte más fisiológica, se produce una pequeña inhibición en la actividad descarboxilasa de hígado y una inhibición mucho mayor en la actividad descarboxilasa de cerebro.

TABLA 29.- Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos a una concentración 0,25 mM sobre la actividad PPMVA descarboxilasa de hígado y cerebro.

	Actividad enzimática (nmol/30 min/mg prot.)	
	Hígado	Cerebro
Controles	38,71±0,05	12,86±1,98
Mezcla de fenilalanina y metabolitos	35,59±0,64 *	7,44±0,62 **

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
 P= niveles de significación de la t de Student ; P<0,05 *

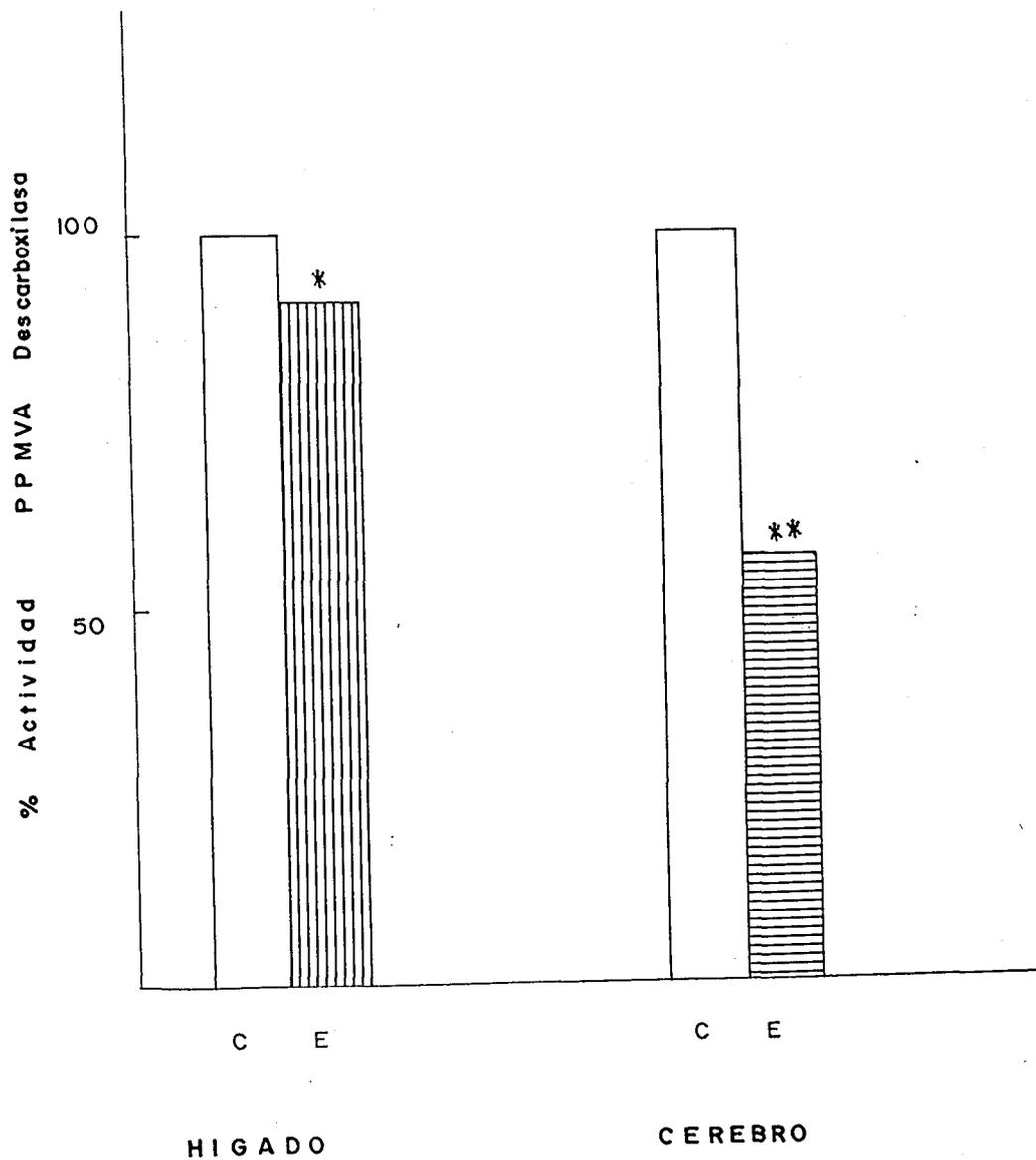


FIG. 32.- Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos a una concentración de 0,25 mM cada uno sobre la actividad PPMVA descarboxilasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro. C=controles; E=mezcla de metabolitos y fenilalanina.

4.E. Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos sobre la actividad HMG-CoA reductasa de hígado y cerebro.

Considerando el papel principal de la enzima HMG-CoA reductasa como reguladora del metabolismo del colesterol, se ha realizado la siguiente experiencia encaminada a observar si sobre esta enzima se provocaba alguna acción por la presencia de concentraciones de fenilalanina y sus metabolitos semejantes a las ensayadas sobre la descarboxilasa.

Como se puede observar en la TABLA 30 (FIG.33) se produce una inhibición mayor en cerebro que en hígado.

El estudio comparativo del efecto de la mezcla ensayada sobre las actividades reductasa y descarboxilasa pone de manifiesto que en ambos casos la inhibición es mayor en cerebro que en hígado. Así mismo, en cada órgano, la actividad reductasa resulta más afectada que la descarboxilasa (FIG. 34)

TABLA 30.- Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos a concentración 0,25 mM sobre la actividad HMG-CoA reductasa de hígado y cerebro.

	Actividad HMG-CoA reductasa (pmol/15 min/mg prot.)	
	Hígado	Cerebro
	<hr/>	
Controles	1060,25±10,80	384,00± 6,69
Mezcla de fenilalanina y metabolitos.	744,75±53,33 *	91,39±15,5 *
	<hr/>	

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones ± S.E.M.
 F= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *

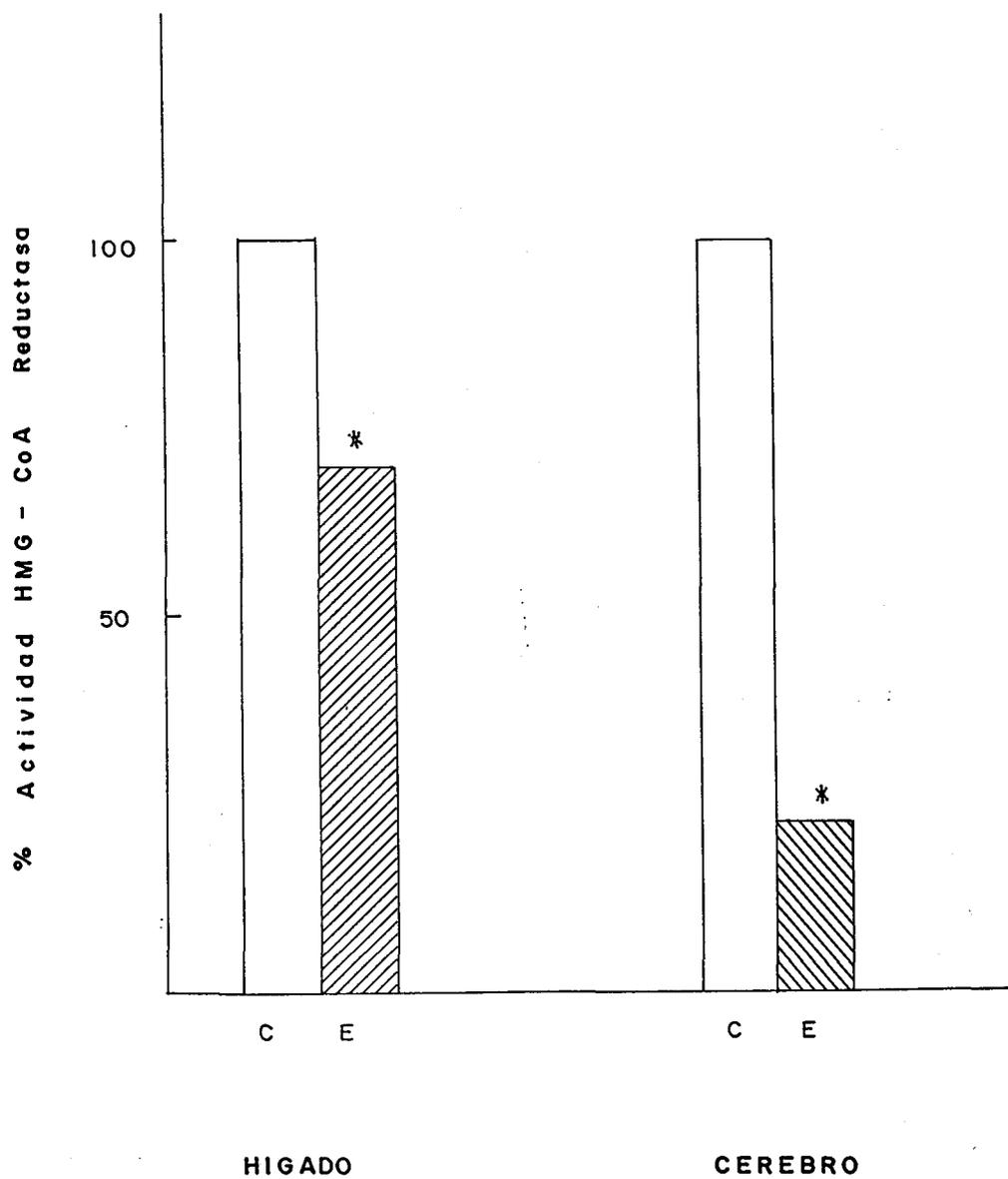
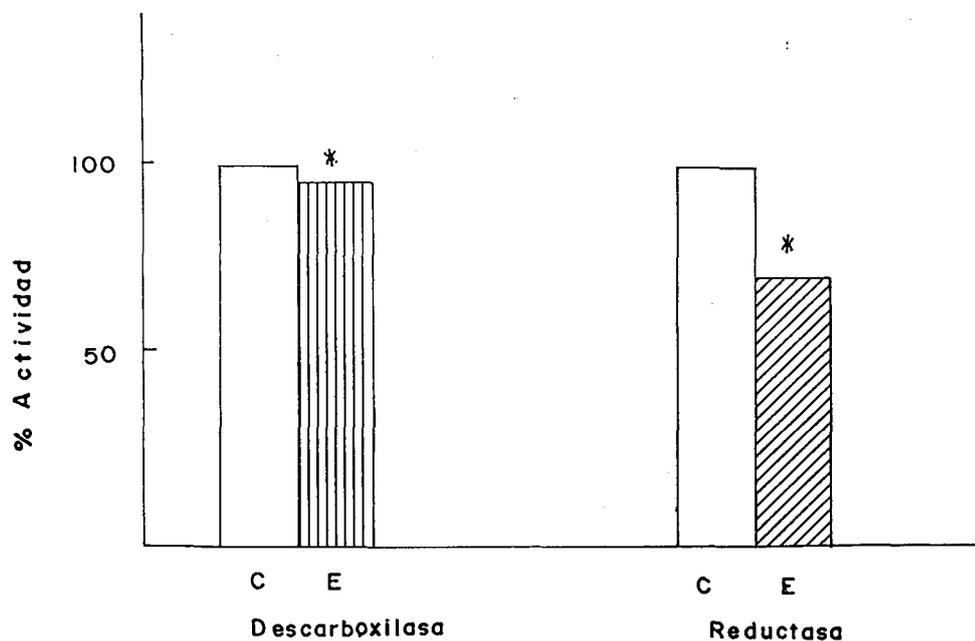
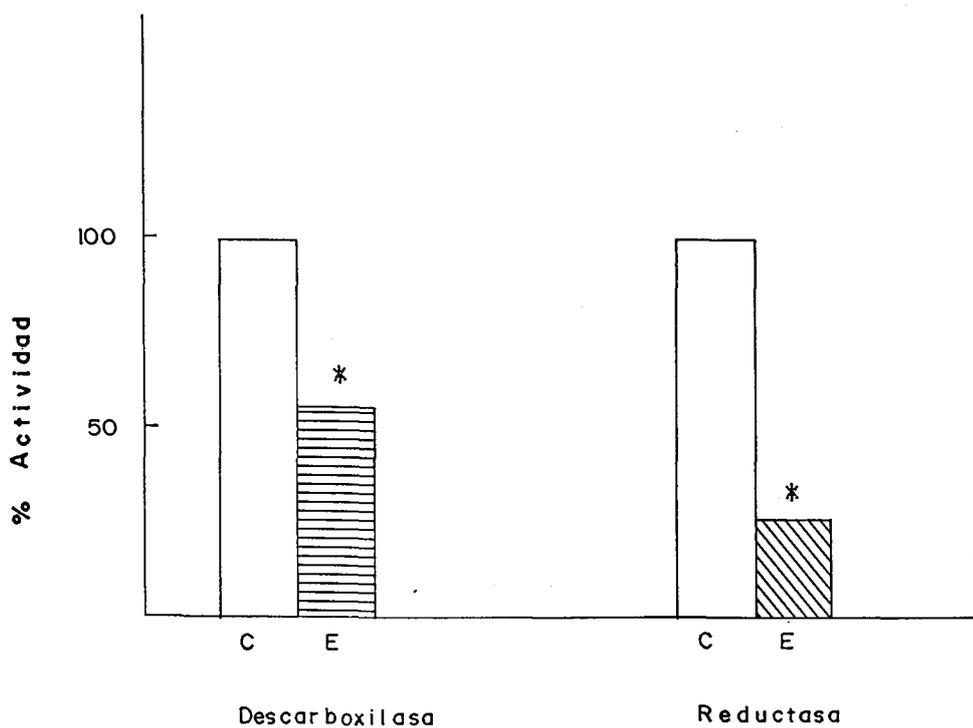


FIG. 33.- Efecto "in vitro" de una mezcla de fenilalanina y sus metabolitos a una concentración de 0,25 mM cada uno sobre la actividad HMG-CoA reductasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro. C=controles; E=mezcla de metabolitos y fenilalanina.



HIGADO



CEREBRO

FIG. 34.- Estudio comparativo del efecto de una mezcla de fenilalanina y algunos metabolitos a una concentración 0,25 mM sobre las actividades PFMVA descarboxilasa y HMG-CoA reductasa. Porcentajes de actividad en hígado y cerebro.

4.F. Producción de un modelo experimental de hiperfenilalaninemia en pollo.

Para la producción del modelo experimental de hiperfenilalaninemia en pollo hemos suministrado a un lote de animales una dieta estandar suplementada con 5% de fenilalanina y 0,4% de α -metil fenilalanina (dieta sólida) y a otro lote de animales una dieta estandar suplementando el agua de bebida con 10% de fenilalanina y 0,8% de α -metil fenilalanina (dieta líquida)

4.F.1. Efecto de las dietas empleadas sobre el peso de los animales y de los órganos estudiados.

Como se observa en la TABLA 31 en pollos de 9 días de edad que mantienen una dieta desde hace 4 días solo se aprecian diferencias significativas en el peso del hígado y en el caso de la dieta sólida. El peso de los animales así como el peso del cerebro no sufre variación significativa.

En cambio en la TABLA 32 se aprecia como en pollos de 14 días de edad que mantienen una dieta desde hace 9 días sí se aprecia una disminución significativa tanto del peso de los animales como del cerebro e hígado en los dos lotes de animales, es decir, en los alimentados con la dieta sólida así como en los que la suplementación se hace en el agua de bebida.

TABLA 31.- Efecto de una dieta con fenilalanina y α -metil-fenilalanina sobre el peso del animal entero, del hígado y del cerebro. Pollos de 9 días de vida y 4 días de dieta.

Dieta sólida 5% fenilalanina, 0,4% α -metil fenilalanina.

Dieta líquida 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

	Peso animal entero (g)	Peso hígado (g)	Peso cerebro (g)
Controles	63,47 \pm 2,56	2,36 \pm 0,09	1,14 \pm 0,02
Dieta sólida	56,93 \pm 2,14	1,84 \pm 0,07 *	1,18 \pm 0,31
Dieta líquida	59,86 \pm 1,87	2,35 \pm 0,10	1,13 \pm 0,03

Los resultados se expresan como resultado de seis experiencias \pm S.E.M.
P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *

TABLA 32.- Efecto de una dieta con fenilalanina y α -metil-fenilalanina sobre el peso del animal, del hígado y del cerebro. Pollos de 14 días de vida y 9 días de dieta.
 Dieta sólida: 5% fenilalanina, 0,4% α -metil fenilalanina.
 Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

	Peso animal entero (g)	Peso hígado (g)	Peso cerebro (g)
Controles	94,08+3,11	3,58+0,26	1,34+0,02
Dieta sólida	72,20+3,39 *	2,29+0,08 *	1,21+0,04 *
Dieta líquida	75,40+5,16 *	2,50+0,22 *	1,20+0,05 *

Los resultados se expresan como la media de seis determinaciones +S.E.M.
 P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *

4.F.2. Variación de la relación fenilalanina/tirosina con las distintas dietas y con distinto tiempo de tratamiento.

Uno de los parametros principales para determinar que nos encontramos ante una hiperfenilalaninemia es comprobar que la relación Fen/Tir está aumentada en nuestras experiencias y como se deduce de la TABLA 33 ya a los 4 días de duración de la dieta, la relación Fen/Tir en plasma aumenta considerablemente con la dieta sólida y algo menos con la administración de la dieta líquida. Sin embargo a los 9 días de administración de la dieta estos valores tienden a igualarse en los dos tipos de dietas administradas aunque la dieta sólida sigue presentando una relación Fen/Tir mayor.

En el caso del cerebro, con los dos tipos de dietas se alcanzan valores semejantes en la relación Fen/Tir y estos valores son estables a partir del 4^º día de administración de las mismas.

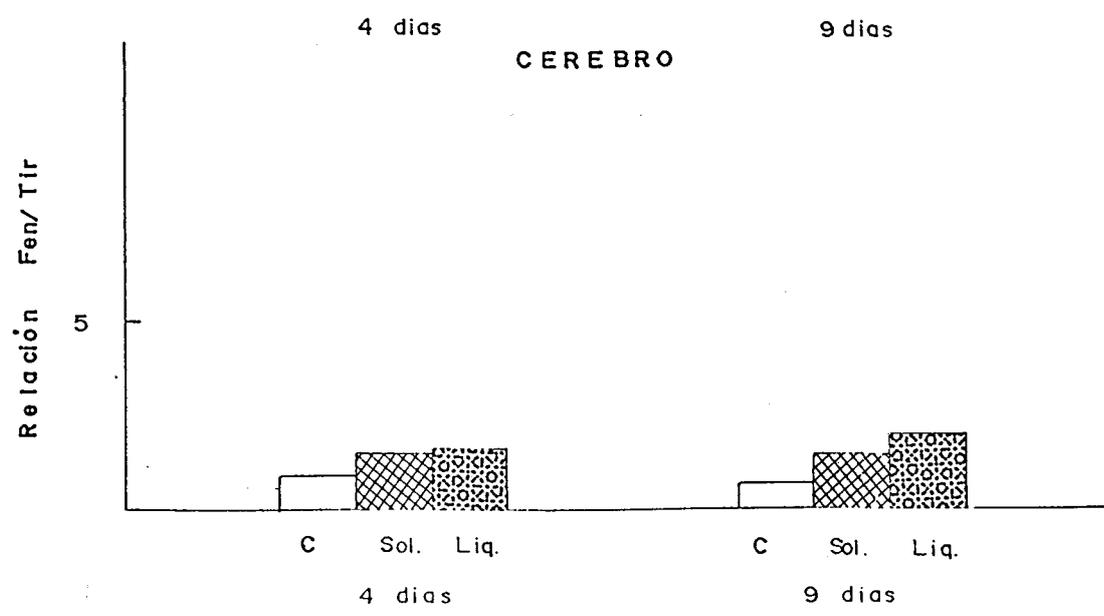
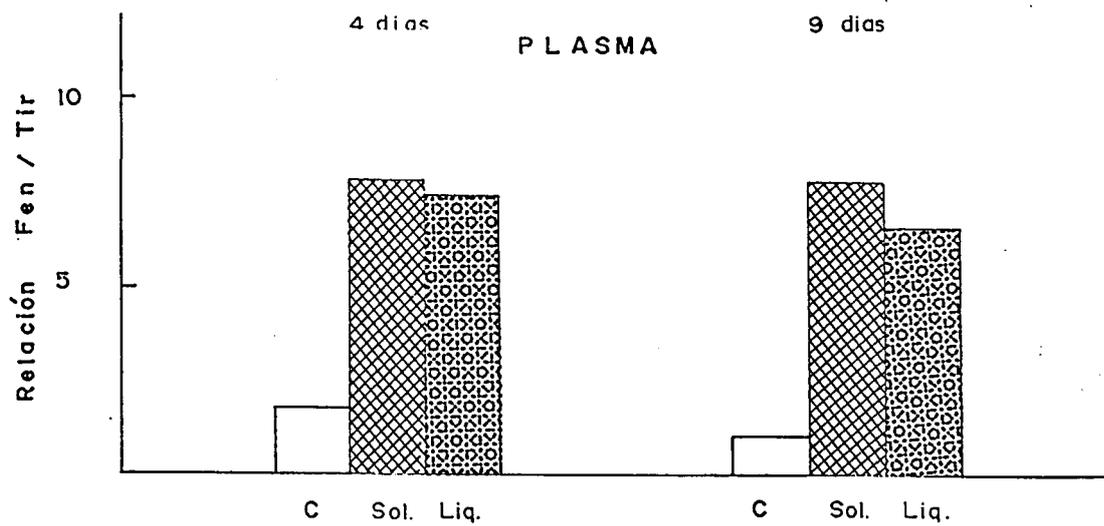
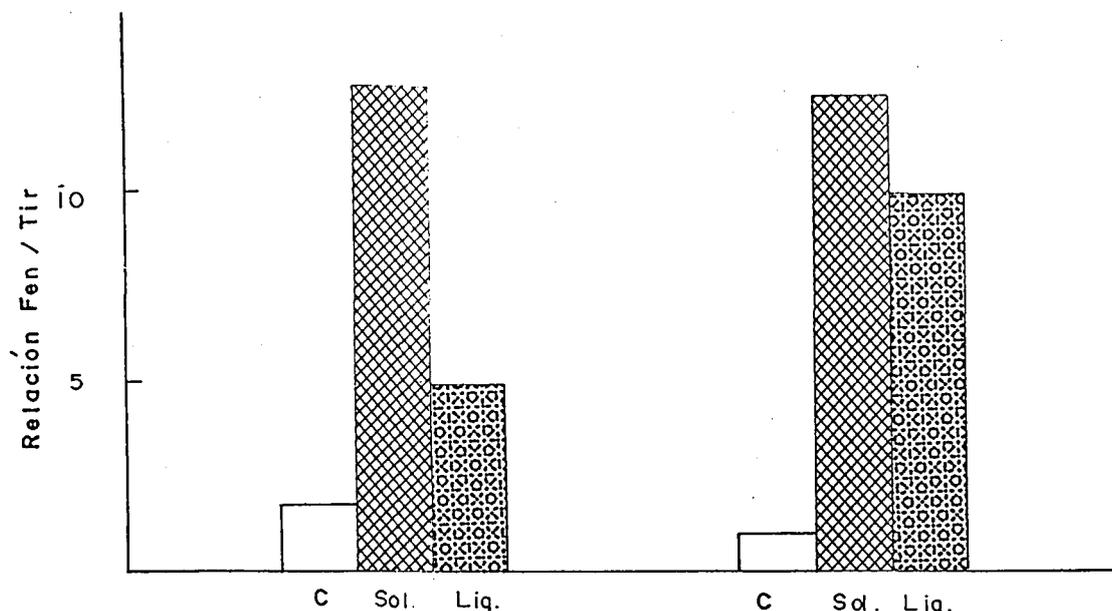
En hígado también se alcanzan valores bastante semejantes en cuanto a relación Fen/Tir con los dos tipos de dieta y estos se alcanzan ya a los 4 días de duración de la dieta manteniéndose estables con la continuación del tratamiento.

Segun se desprende de la TABLA 33 (FIG. 35) los mayores niveles en cuanto a relación Fen/Tir se alcanzan en plasma, con dieta sólida sobre todo. Con respecto a los dos órganos estudiados es el cerebro el que alcanza mayores valores de Fen/Tir, alcanzándose estos ya a los 4 días de administración de las dietas. En hígado estos valores son mucho mas pequeños, alcanzándose también a los 4 días de administración de las dietas.

TABLA 33.- Variación de la relación Fen/Tir con los tipos de dieta y con distinto tiempo de tratamiento en plasma, cerebro e hígado.

	Plasma		Cerebro		Hígado	
	dias de tratamiento		dias de tratamiento		dias de tratamiento	
	4	9	4	9	4	9
Control	1,66	0,93	1,80	1,00	0,96	0,80
Dieta sólida	12,80	12,50	7,80	7,80	1,41	1,60
Dieta líquida	4,08	10,00	7,50	6,70	1,60	2,18

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones +S.E.M,



HIGADO

FIG. 35.- Variación de la relación Fen/Tir con los tipos de dieta y con distinto tiempo de tratamiento en plasma, cerebro e hígado.

4.F.3. Efecto de las distintas dietas sobre la concentración de aminoácidos.

4.F.3.1. Efecto en plasma.

Las concentraciones de aminoácidos en el plasma de los pollos sometidos a los dos tipos de dietas sufren una variación con respecto a los controles que se pueden resumir, según se desprende de las TABLAS 34 y 35 (FIG. 36 y 37), en una disminución de la concentración de casi todos los aminoácidos citados con la excepción del ácido aspártico y glicina y en menor proporción del glutámico y la glutamina.

Como era de esperar la fenilalanina sufre también un gran aumento en su valor absoluto con respecto a los controles mientras que la tirosina a los 4 días de duración de la dieta permanece aun por debajo de los valores normales sufriendo un ligero ascenso a los 9 días de duración de la dieta.

4.F.3.2. Efecto en cerebro.

La administración de las dietas tendentes a provocar una hiperfenilalaninemia produce en el cerebro de los animales una disminución casi general en la concentración de aminoácidos. Solamente se aprecia una elevación significativa de glicina así como también de serina, aunque esta última en algunos casos no sea significativa (TABLAS 36 y 37); (FIG. 38 y 39).

Los valores absolutos de fenilalanina aumentan considerablemente y aunque en la FIG. aparecen elevados los valores de tirosina, hay que constatar que estos últimos no son estadísticamente significativos.

4.F.3.3. Efecto en hígado.

En hígado, según se desprende de las TABLAS 38 y 39 (FIG 40 y 41) no se produce una desviación muy apreciable con respecto a los valores controles aunque si conviene destacar una disminución de alanina, isoleucina y leucina. Los valores elevados de fenilalanina si son significativos estadísticamente mientras que los de tirosina no lo son.

TABLA 34.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en plasma
 Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.
 Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.
 Duración de la dieta: 4 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	0,18±0,01	0,33±0,03 *	0,37±0,03 **
Treonina	0,61±0,05	0,39±0,01 *	0,32±0,05 *
Serina	0,58±0,03	0,43±0,02 *	0,45±0,02 *
Glutámico	0,27±0,02	0,26±0,03	0,28±0,03
Glutamina	0,33±0,01	0,35±0,02	0,31±0,01
Glicina	0,26±0,02	0,30±0,01 *	0,29±0,03 *
Alanina	0,88±0,02	0,55±0,01 **	0,47±0,03 ***
Valina	0,39±0,03	0,18±0,02 **	0,09±0,01 **
Isoleucina	0,14±0,02	0,06±0,03	0,07±0,02
Leucina	0,24±0,01	0,07±0,03 *	0,06±0,02 **
Tirosina	0,30±0,02	0,20±0,02 *	0,17±0,03 **
Fenilalanina	0,50±0,04	0,96±0,05 **	2,19±0,02 ****
Histidina	0,28±0,05	0,11±0,05	0,12±0,04
Ornitina	0,55±0,03	0,52±0,03	0,49±0,05
Lisina	0,63±0,02	0,25±0,02 ***	0,26±0,01 ***
Amonio	0,30±0,02	0,31±0,05	0,30±0,01

Resultados expresados en $\mu\text{mol/g}$ de plasma \pm S.E.M. (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

P<0,0005***

TABLA 35.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en plasma.
 Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.
 Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.
 Duración de la dieta: 9 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	0,18±0,01	0,30±0,02 *	0,34±0,04 *
Treonina	0,63±0,02	0,28±0,04 **	0,26±0,04 **
Serina	0,52±0,03	0,49±0,01	0,40±0,03 *
Glutámico	0,31±0,03	0,37±0,02	0,40±0,04
Glutamina	0,30±0,01	0,33±0,03	0,36±0,03
Glicina	0,27±0,03	0,38±0,03 *	0,37±0,02 *
Alanina	0,84±0,03	0,64±0,03 *	0,54±0,02 **
Valina	0,33±0,04	0,26±0,05	0,24±0,04
Isoleucina	0,16±0,03	0,10±0,02	0,13±0,03
Leucina	0,22±0,03	0,15±0,03	0,17±0,03
Tirosina	0,15±0,04	0,20±0,02	0,16±0,04
Fenilalanina	0,14±0,04	2,00±0,04 ****	2,00±0,03 ****
Histidina	0,16±0,04	0,13±0,03	0,14±0,05
Ornitina	0,76±0,02	0,64±0,06	0,79±0,30
Lisina	0,68±0,06	0,21±0,07 *	0,20±0,50
Amonio	0,23±0,70	0,25±0,50	0,22±0,09

Resultados expresados en $\mu\text{mol/g}$ de plasma \pm S.E.M. (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

P<0,0005***

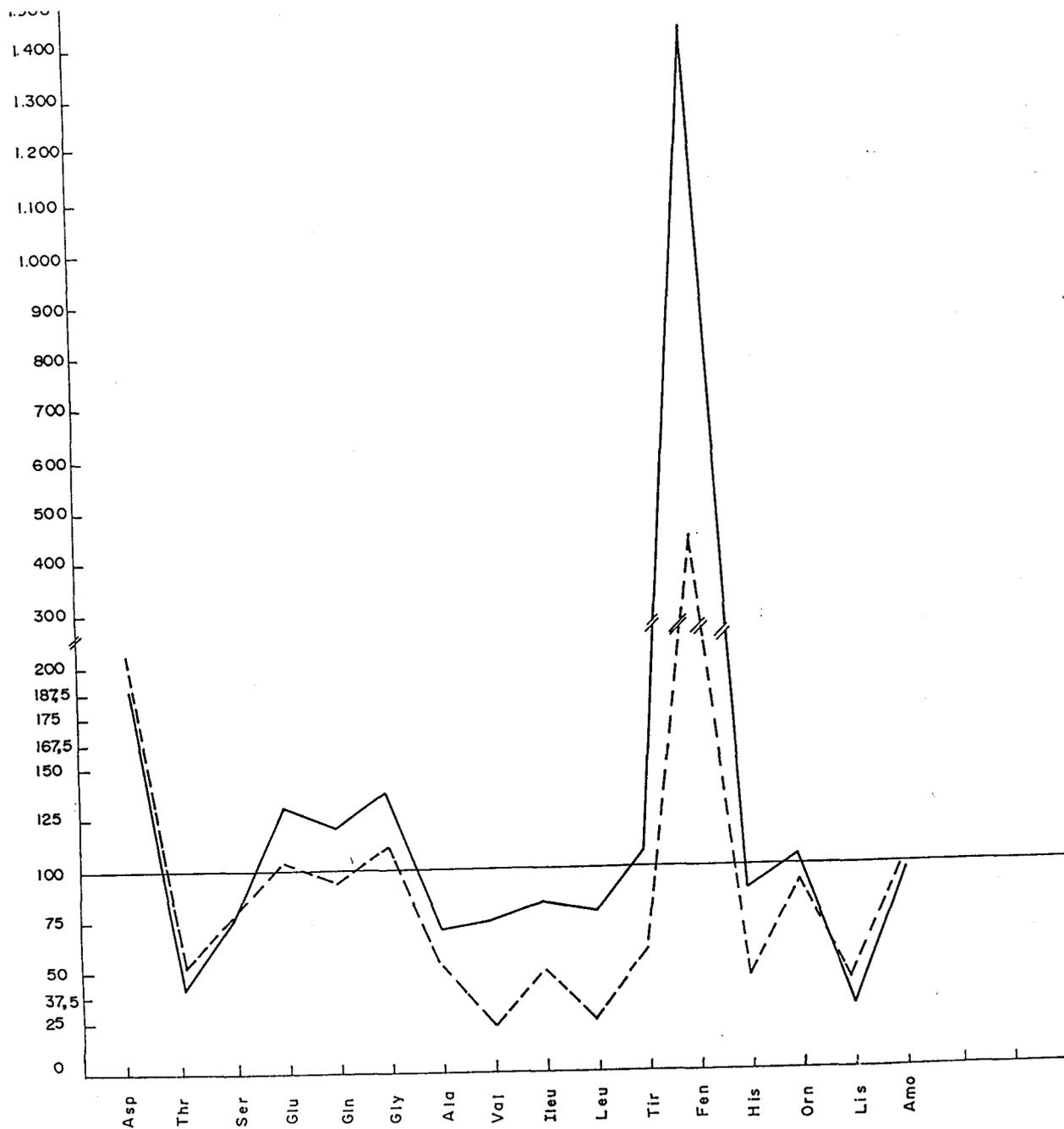


FIG. 36.-Efecto de la dieta sólida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en plasma.
 La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

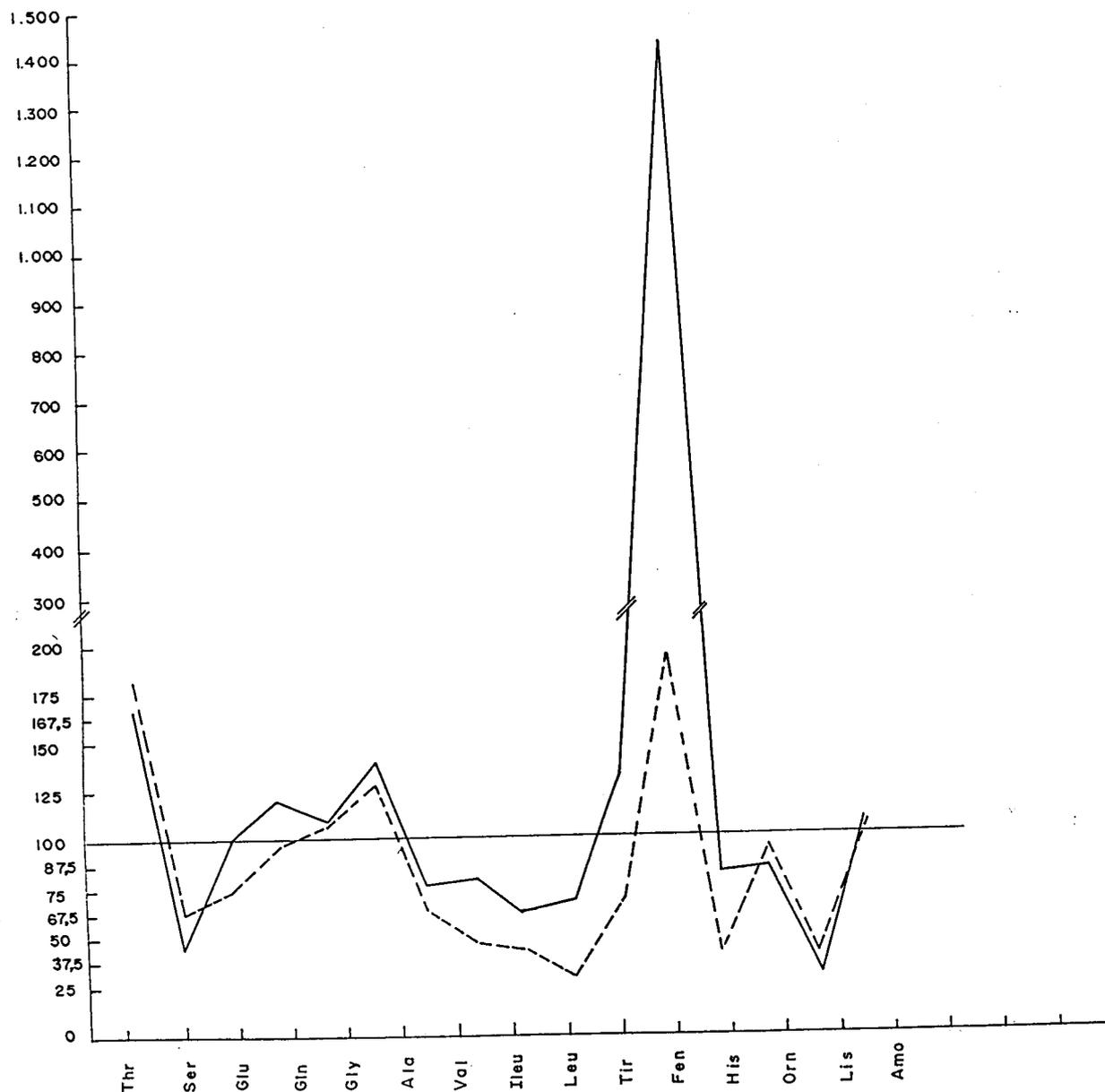


FIG. 37.-Efecto de la dieta líquida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en plasma .
 La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

TABLA 36.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en cerebro

Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.

Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

Duración de la dieta: 4 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	3,49±0,17	2,72±0,30	1,76±0,06 *
Treonina	0,27±0,02	0,21±0,01	0,18±0,00 *
Serina	0,37±0,03	0,47±0,03 **	0,63±0,08 **
Glutámico	2,81±0,10	2,53±0,28	2,42±0,23
Glutamina	1,57±0,04	1,50±0,00	1,11±0,03
Glicina	0,92±0,02	1,36±0,11 *	0,99±0,02 *
Alanina	0,49±0,00	0,58±0,00	0,54±0,03
Valina	0,07±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00
Isoleucina	0,05±0,00	0,04±0,01	0,04±0,00
Leucina	0,10±0,00	0,06±0,01	0,03±0,00
Tirosina	0,05±0,00	0,08±0,01	0,07±0,01
Fenilalanina	0,09±0,00	0,60±0,11 **	0,55±0,09 **
Histidina	0,10±0,00	0,12±0,03	0,08±0,00
Ornitina	0,53±0,09	0,27±0,03	0,27±0,09
Lisina	0,31±0,01	0,28±0,06	0,28±0,09
Amonio	0,35±0,01	0,31±0,06	0,22±0,09
Triptófano	0,59±0,00	0,36±0,06	0,47±0,06
GABA	2,62±0,00	2,52±0,01	2,43±0,01

Resultados expresados en $\mu\text{mol/g}$ de cerebro \pm S.E.M. (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

TABLA 37.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en cerébro

Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.

Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

Duración de la dieta: 9 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	3,08±0,26	2,69±0,35	2,42±0,35
Treonina	0,23±0,02	0,19±0,00	0,20±0,00
Serina	0,29±0,03	0,36±0,06 **	0,32±0,02 **
Glutámico	3,53±1,01	2,88±0,26	3,51±0,86
Glutamina	1,37±0,00	1,02±0,02 **	0,84±0,04 **
Glicina	0,91±0,19	1,11±0,13*	1,26±0,02 *
Alanina	0,44±0,04	0,44±0,03	0,50±0,01
Valina	0,07±0,00	0,05±0,01	0,05±0,00
Isoleucina	0,07±0,01	0,04±0,01	0,03±0,00
Leucina	0,10±0,00	0,06±0,01	0,05±0,00
Tirosina	0,06±0,00	0,09±0,02	0,08±0,01
Fenilalanina	0,06±0,00	0,61±0,11 ***	0,63±0,00 ***
Histidina	0,05±0,02	0,04±0,02	0,05±0,02
Ornitina	0,61±0,00	0,35±0,09	0,49±0,00
Lisina	0,31±0,02	0,28±0,04	0,22±0,02
Amonio	0,32±0,07	0,25±0,07	0,30±0,00
Triptófano	0,54±0,13	0,23±0,02	0,41±0,01
GABA	2,44±0,06	1,82±0,10	2,09±0,25

Resultados expresados en $\mu\text{mol/g}$ de cerébro \pm S.E.M (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

P<0,0005***

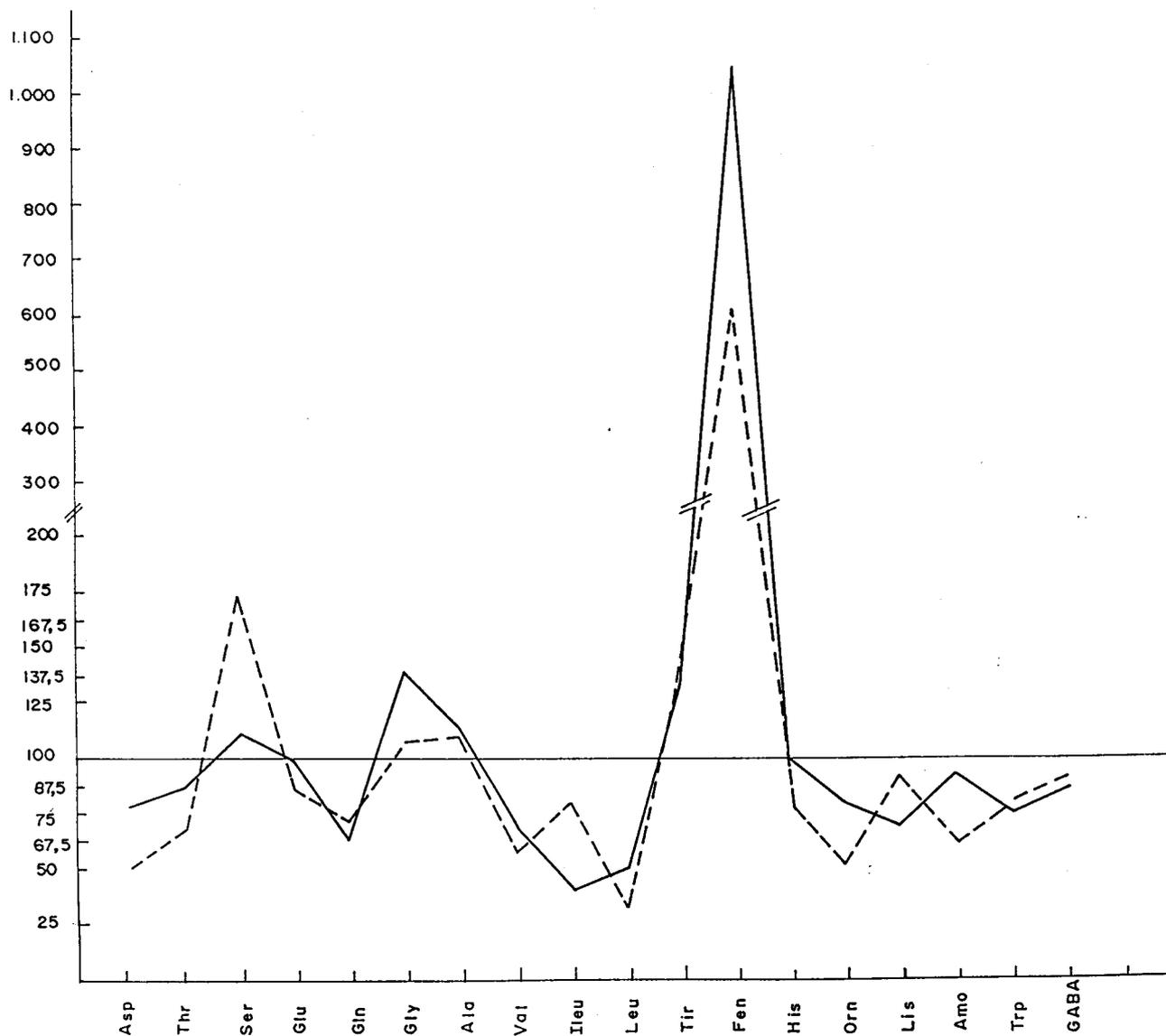


FIG. 38.-Efecto de la dieta sólida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en cerebro.
La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

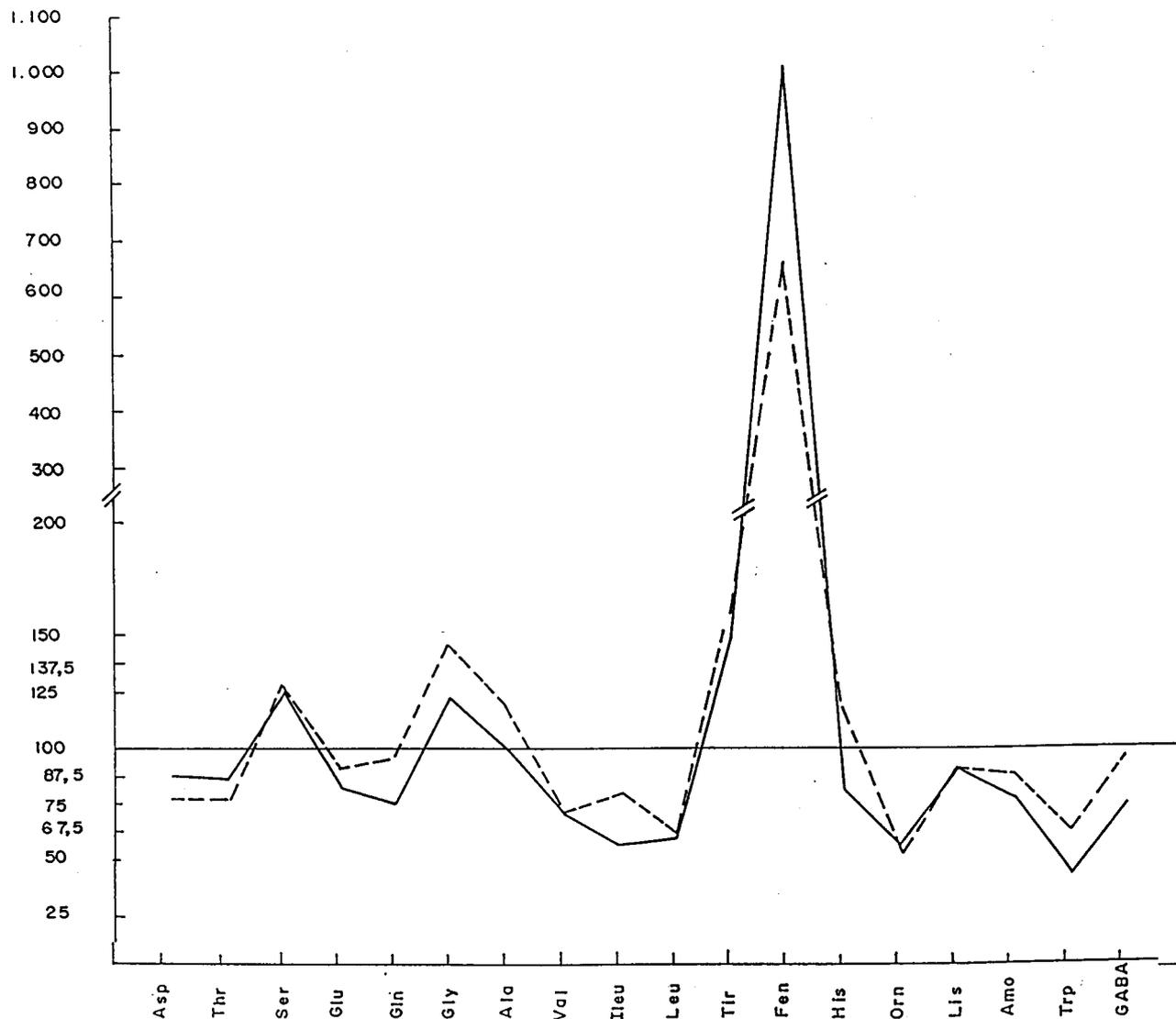


FIG. 39.-Efecto de la dieta líquida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en cerebro. La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

TABLA 38.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en hígado.

Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.

Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

Duración de la dieta: 4 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	2,16 \pm 0,39	1,51 \pm 0,45	1,42 \pm 0,47
Treonina	0,77 \pm 0,25	0,15 \pm 0,02 **	0,33 \pm 0,01 **
Serina	2,28 \pm 0,37	1,59 \pm 0,53	1,13 \pm 0,27
Glutámico	1,22 \pm 0,17	0,88 \pm 0,11	0,98 \pm 0,02
Glutamina	1,23 \pm 0,07	1,05 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01
Glicina	0,57 \pm 0,28	0,53 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01
Alanina	0,63 \pm 0,20	0,30 \pm 0,08 *	0,28 \pm 0,12 *
Valina	0,33 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02 **	0,19 \pm 0,02 *
Isoleucina	0,16 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01 **	0,09 \pm 0,02 *
Leucina	0,50 \pm 0,03	0,24 \pm 0,05 *	0,30 \pm 0,07 *
Tirosina	0,26 \pm 0,02	0,23 \pm 0,05	0,36 \pm 0,10
Fenilalanina	0,25 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01 **	0,51 \pm 0,05 **
Histidina	0,54 \pm 0,10	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Ornitina	0,71 \pm 0,00	0,77 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01
Lisina	0,56 \pm 0,09	0,46 \pm 0,00	0,41 \pm 0,00

Resultados expresados en μ mol/g de hígado \pm S.E.M. (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student. P<0,05 *; P<0,005 **

TABLA 39.- Efecto de la administración de las dietas sobre la concentración de aminoácidos en hígado.

Dieta sólida: 5% fenilalanina 0,4% α -metil fenilalanina.

Dieta líquida: 10% fenilalanina y 0,8% α -metil fenilalanina.

Duración de la dieta: 9 días.

Aminoácidos	Controles	Dieta sólida	Dieta líquida
Aspártico	2,98±0,28	2,03±0,41	2,01±0,32
Treonina	0,85±0,20	0,49±0,16 *	0,53±0,16 *
Serina	1,84±0,56	1,60±0,22	1,68±0,30
Glutámico	1,47±0,20	1,48±0,29	1,36±0,04
Glutamina	1,33±0,06	1,33±0,04	1,33±0,03
Glicina	0,47±0,15	0,70±0,13	0,68±0,09
Alanina	0,68±0,08	0,43±0,18 *	0,36±0,21 *
Valina	0,25±0,09	0,25±0,02	0,30±0,04
Isoleucina	0,15±0,04	0,13±0,01	0,13±0,02
Leucina	0,41±0,13	0,45±0,04	0,39±0,07
Tirosina	0,24±0,08	0,49±0,02	0,63±0,06
Fenilalanina	0,20±0,06	1,07±0,16 **	1,04±0,26 **
Histidina	0,47±0,11	0,39±0,07	0,32±0,05
Ornitina	0,93±0,04	1,17±0,01	1,10±0,12
Lisina	0,43±0,18	0,39±0,02	0,34±0,07

Resultados expresados en μ mol/g de hígado \pm S.E.M. (n=6)

P= niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *; P<0,005 **

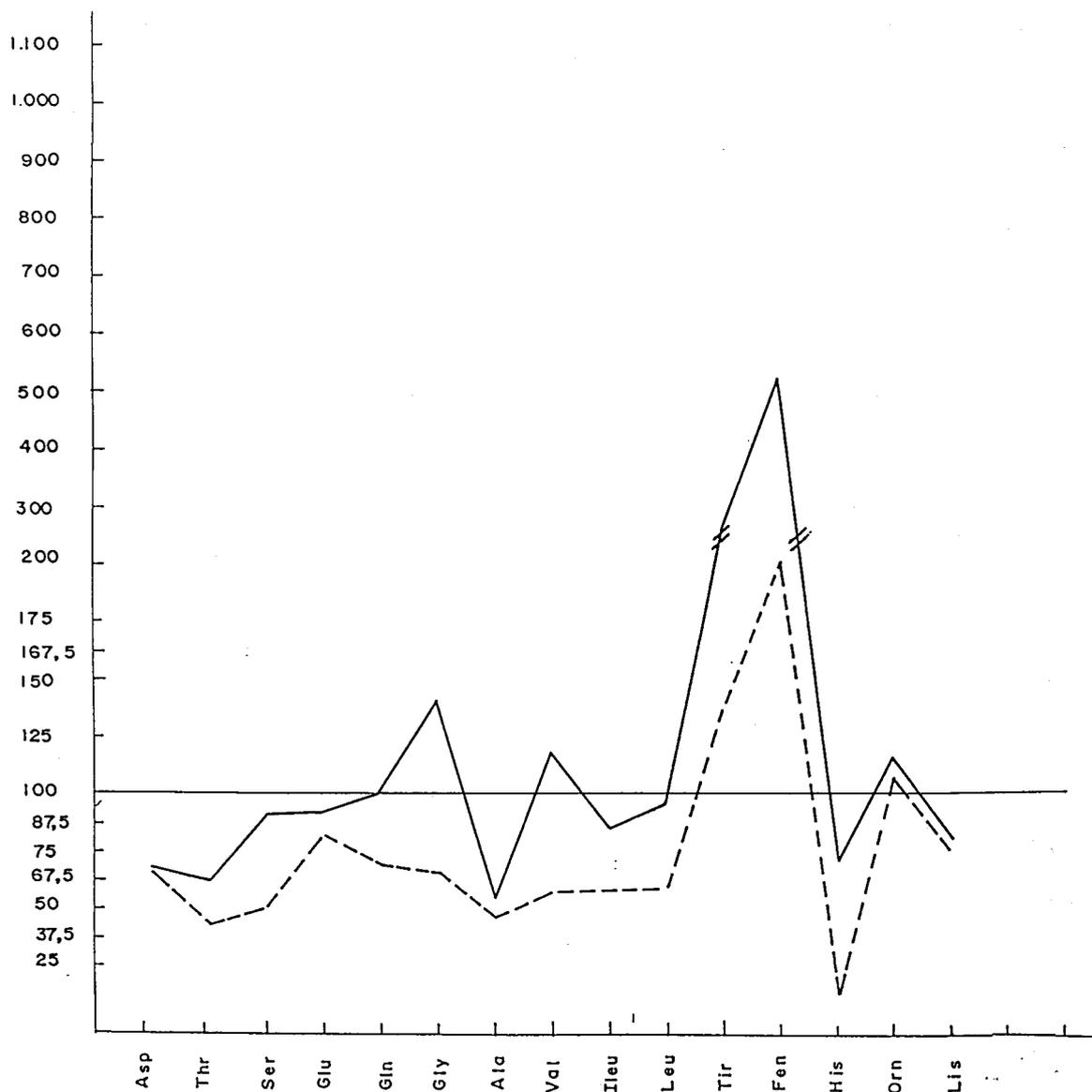


FIG. 40.-Efecto de la dieta sólida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en hígado. La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

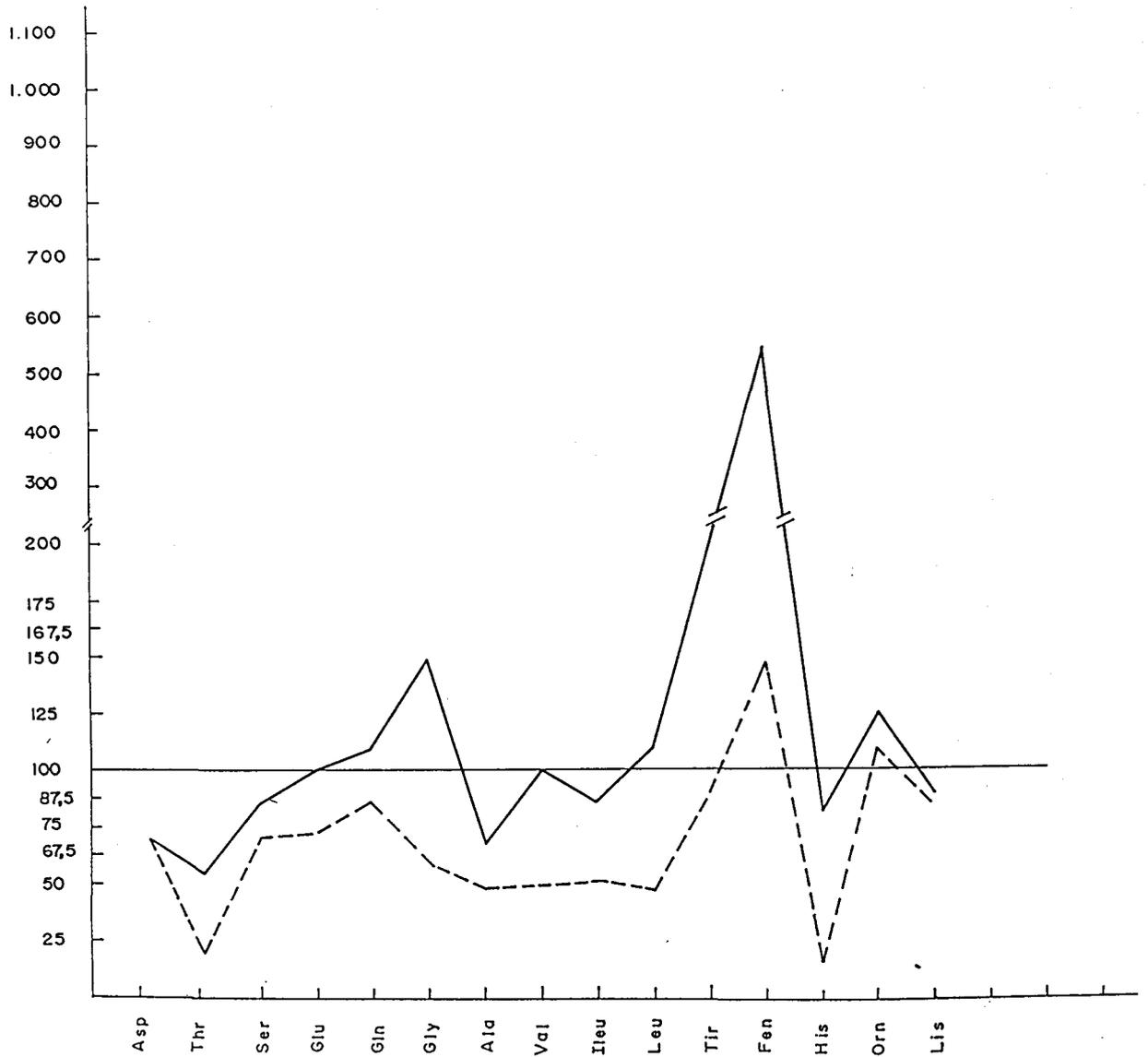


FIG. 41.-Efecto de la dieta líquida con distintos tiempos de tratamiento sobre la concentración de aminoácidos en hígado. La línea discontinua corresponde a 4 días de tratamiento y la línea continua a 9 días de tratamiento.

4.G. Efecto de la hiperfenilalaninemia experimental sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.

Una vez comprobado que los pollos sometidos a las dos dietas ensayadas presentan una situación de hiperfenilalaninemia experimental, se pasó a comprobar en experiencias "in vivo" si esta situación afecta a la actividad PPMVA descarboxilasa.

La TABLA 40 (FIG. 42) muestra como, una vez establecida la situación de hiperfenilalaninemia, la actividad PPMVA descarboxilasa sufre una inhibición tanto en hígado como en cerebro. Comparando los distintos tiempos de exposición a las distintas dietas no se observan grandes diferencias entre los 4 ó los 9 días, si bien la inhibición es algo mayor cuando se han sometido a 9 días de ingesta de la dieta experimental.

Con respecto a las dos dietas ensayadas, la inhibición es también aproximadamente igual en ambos casos, a pesar de que la concentración de fenilalanina y -metil fenilalanina difiere bastante de una dieta a otra.

TABLA 40.- Efecto "in vivo" de dietas suplementadas con fenilalanina y α -metil fenilalanina sobre la actividad PPMVA descarboxilasa.
 Dieta solida: 5% fenilalanina, 0,4% α -metil-fenilalanina.
 Dieta liquida: 10% fenilalanina, 0,8% α -metil-fenilalanina.

	Hígado		Cerebro	
	Dias de tratamiento		Dias de tratamiento	
	4	9	4	9
Controles	35,37±1,57	39,79±1,53	15,69±0,38	18,79±0,73
Dieta sólida	24,77±1,30 *	23,78±0,62 ***	9,61±0,63 **	10,09±0,45 ***
Dieta líquida	24,88±0,96 **	23,66±0,49 ***	10,41±1,03 *	10,39±0,83 **

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones±S.E.M.
 P=niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *,P<0,005 **;
 P<0,0005 ***

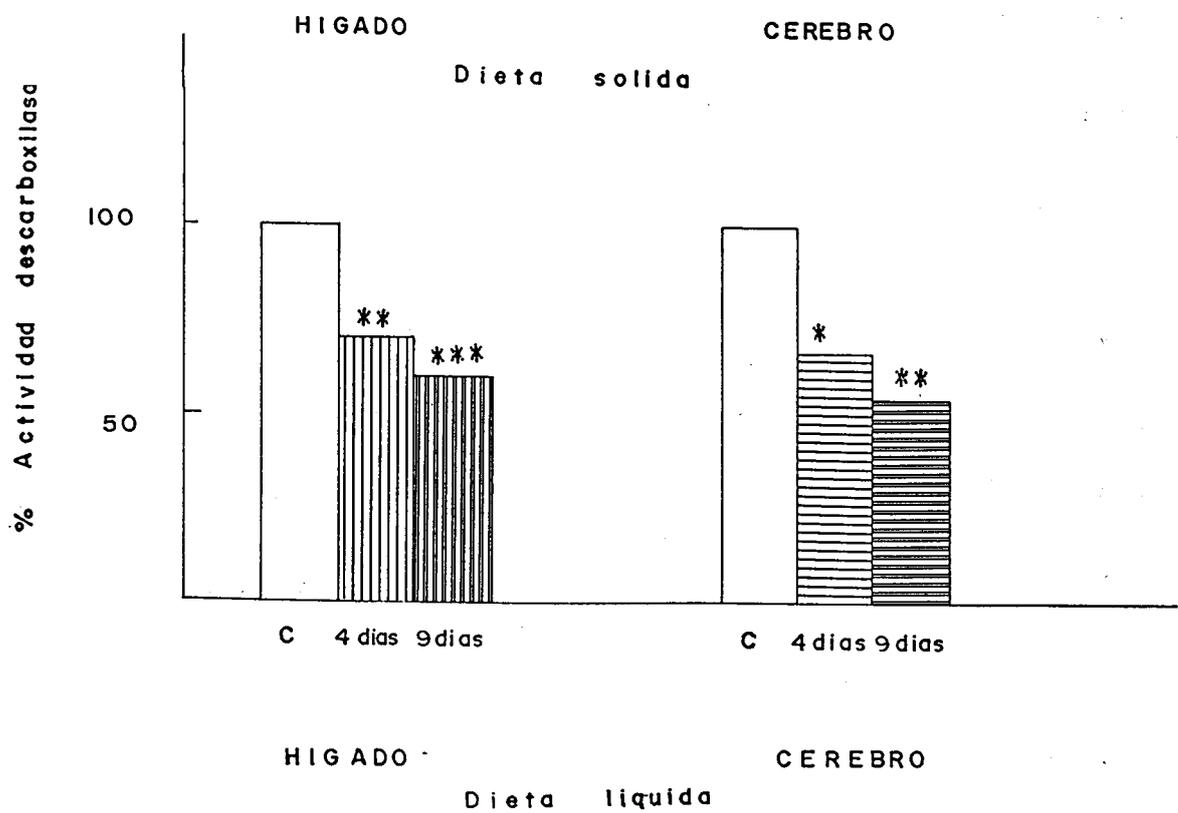
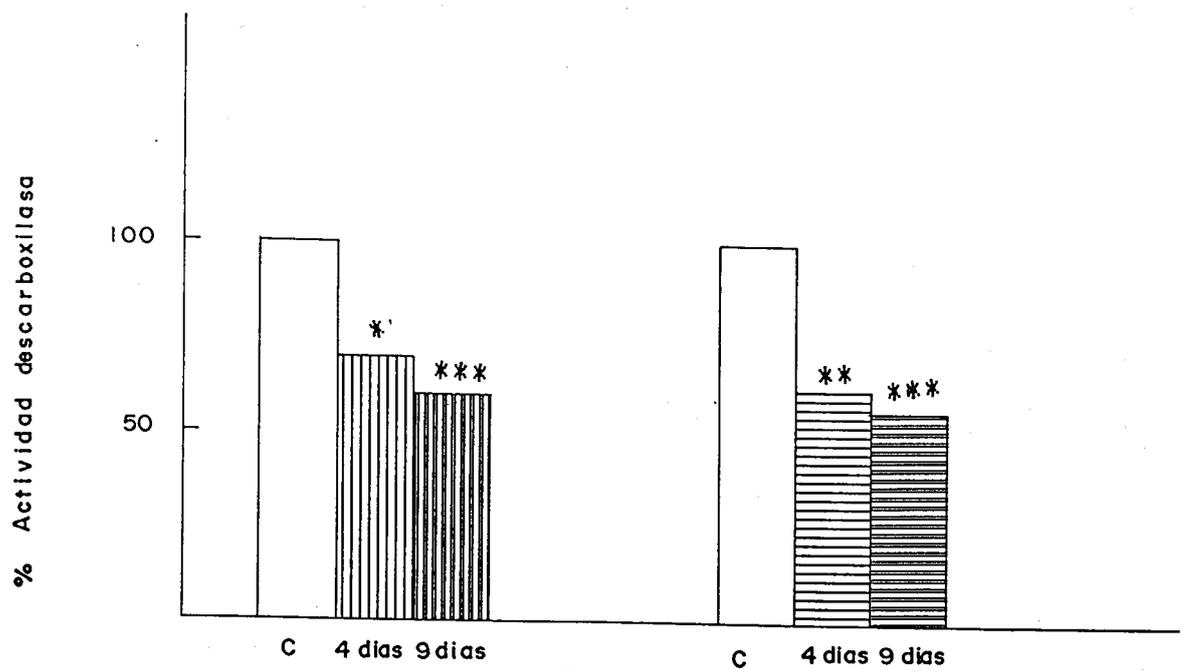


FIG. 42.- Efecto "in vivo" de las dietas sobre la actividad PPMVA descarboxilasa a distintos tiempos de tratamiento. Porcentajes de actividad PPMVA descarboxilasa en higado y cerebro.

4.H. Efecto de la hiperfenilalaninemia experimental sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

El efecto de la hiperfenilalaninemia experimental, provocada en pollos por la ingestión de las dos dietas ensayadas, sobre la actividad HMG-CoA reductasa se expresa en la TABLA 41 (FIG. 43).

Como puede observarse en hígado se produce una fuerte inhibición más pronunciada a los 4 días de ingesta de las dietas. Sin embargo a los 9 días de ingesta la actividad que se encontraba practicamente inhibida parece recuperarse en gran parte.

TABLA 41.- Efecto "in vivo" de dietas suplementadas con fenilalanina y α -metil-fenilalanina sobre la actividad HMG-CoA reductasa en hígado y cerebro.
 Dieta sólida: 5% fenilalanina, 0,4% α -metil fenilalanina.
 Dieta líquida: 10% fenilalanina, 0,8% de α -metil fenilalanina.

	Hígado		Cerebro	
	Días de tratamiento		Días de tratamiento	
	4	9	4	9
Controles	1001,00±60,00	976,60±26,00	616,00±12,00	828,00±12,00
Dieta sólida	56,70±16,40 ***	556,00±22,00 **	450,00± 4,00 ***	559,00±23,00 **
Dieta líquida	123,00±33,00 ***	646,00±26,00 *	576,00± 5,00 **	455,00±29,00 **

Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones + S.E.M.
 P=niveles de significación de la t de Student; P<0,05 *, P<0,005 **;
 P<0,0005 ***

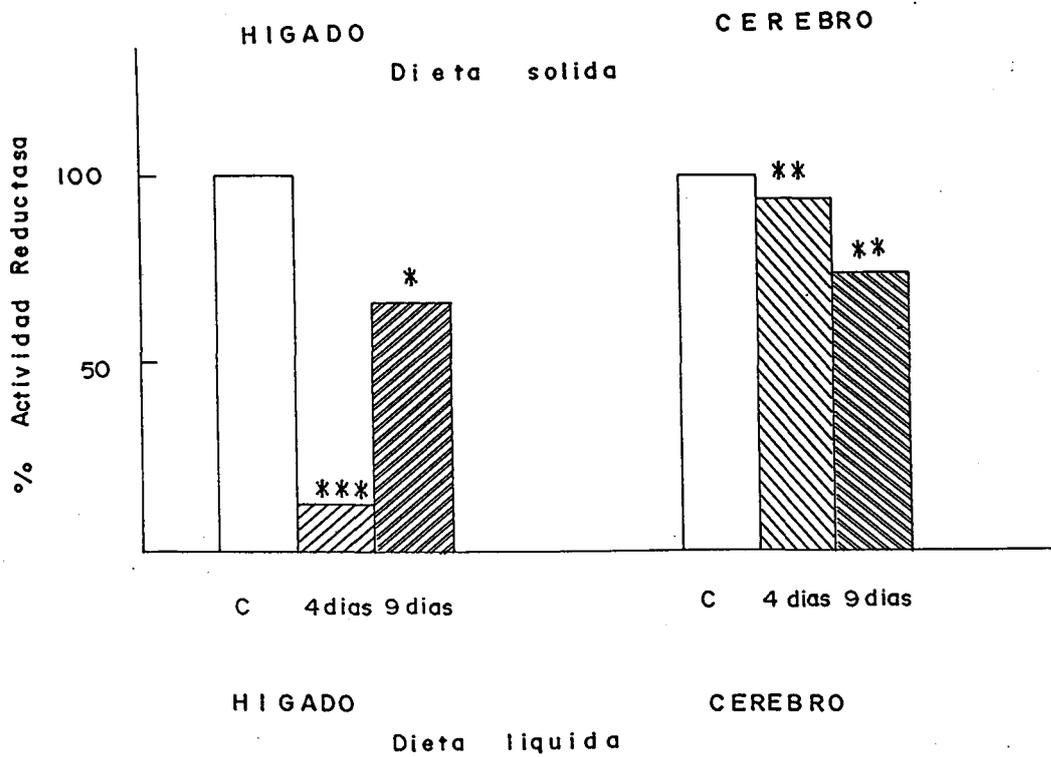
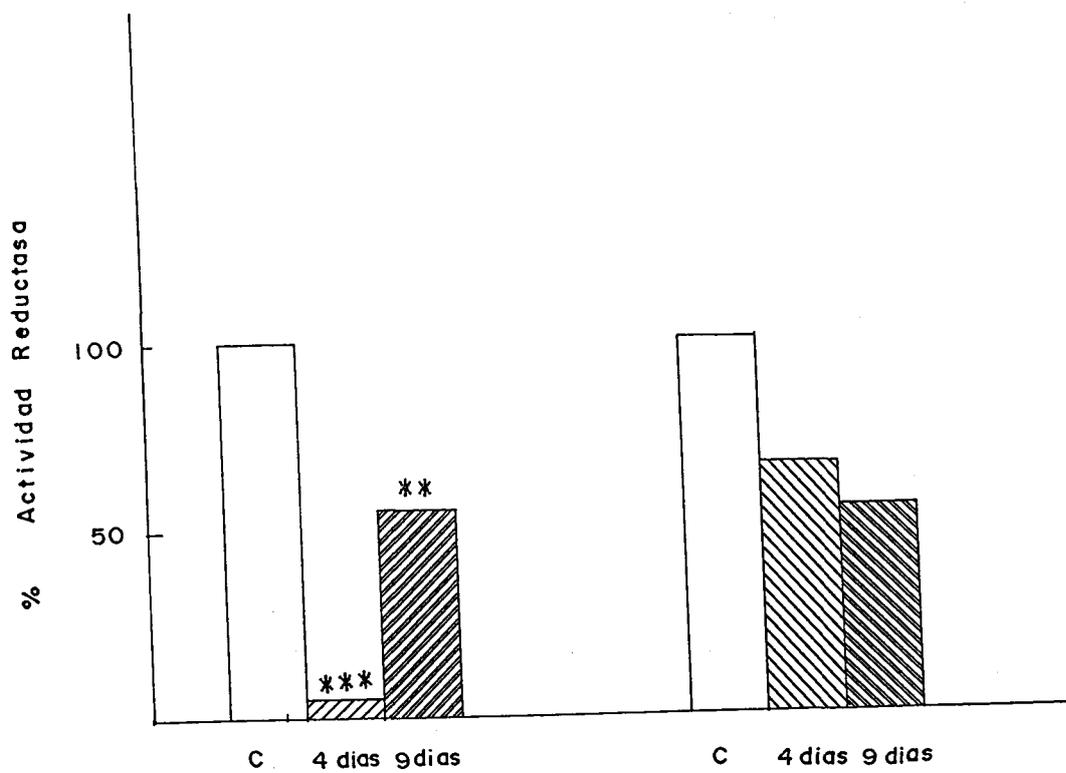


FIG. 43.- Efecto "in vivo" de las dietas sobre la actividad HMG-CoA reductasa a distintos tiempos de tratamiento. Porcentajes de actividad PFMVA descarboxilasa en higado y cerebro.

DISCUSSION

5. DISCUSION

Consideraciones generales

La oligofrénia fenilpirúvica o fenilcetonuria fue identificada en 1934 por Folling, siendo durante mucho tiempo una simple curiosidad bioquímica y una enfermedad aislada. Sin embargo, en la actualidad se cuentan por centenares los casos encontrados en los programas de selección masiva en el recién nacido que se están llevando a cabo en varios países con fines preventivos.

Después de más de 50 años de investigación, la causa del retraso mental propio de esta enfermedad permanece aun desconocida. Se han propuesto varias hipótesis, pero no se cuenta con datos suficientes que las comprueben o las unifiquen. De hecho, se acepta que un defecto en la mielinización es un proceso fundamental que acompaña normalmente a la fenilcetonuria, habiéndose sugerido que una de las causas que más satisfactoriamente podría explicar la hipomielinización asociada a la hiperfenilalaninemia sería la reducción de la biosíntesis del colesterol, principal constituyente lipídico de la mielina. Ello nos ha llevado a investigar el posible efecto de la fenilalanina y de cada uno de sus derivados, que se acumulan anormalmente en estados de fenilcetonuria, sobre las principales enzimas reguladoras de la colesterogenesis.

Los estudios se han llevado a cabo preferentemente en hígado y en cerebro, dada la localización hepática de la enzima fenilalanina hidroxilasa cuya carencia genéticamente controlada es la responsable de la fenilcetonuria y, por otra parte, habida cuenta que es en cerebro donde se alcanzan mayores niveles en la relación fenilalanina/ tirosina, con las consecuencias que de ello se derivan sobre el proceso de mielinización. Se han hecho experiencias "in vitro" e "in vivo" para lo cual ha sido necesario disponer de un modelo experimental de fenilcetonuria, habiéndose elegido al pollo por varios motivos, entre los que podíamos destacar el acúmulo de conocimientos que sobre el metabolismo del colesterol en este animal se posee en el Departamento y, por otra parte, el hecho de que la mielinización en el pollo ocurre

fundamentalmente durante el periodo embrionario y es más rápida que en otras especies.

En efecto, estudios previos obtenidos en nuestro Departamento habian puesto de manifiesto la inducción de un modelo experimental de fenilcetonuria en embrión de pollo entre 11 y 20 dias, es decir, en la etapa en que se produce el punto culminante de la mielinización en esta especie animal (159). Dejando a parte otras consideraciones que seran tratadas con posterioridad, despues de 9 dias de tratamiento se observó un incremento de cerca de 14 veces en la relación fenilalanina/ tirosina en cerebro debido tanto a un aumento de los niveles de fenilalanina como a una disminución de los de tirosina, condiciones ambas que se han encontrado en individuos fenilcetonúricos humanos.

Utilizando embriones de pollo de 19 dias a los que se habia inducido una hiperfenilalaninemia experimental tal como hemos especificado, se ha demostrado que no existen diferencias significativas en las actividades hepáticas HMG-CoA reductasa, MVA cinasa, FMVA cinasa y PPMVA descarboxilasa entre los animales controles e hiperfenilalaninémicos. Sin embargo, los niveles de PPMVA descarboxilasa de cerebro eran significativamente inferiores en los animales hiperfenilalaninémicos, mientras que el resto de las enzimas ensayadas de cerebro tampoco variaban sensiblemente (109).

Basándonos en estos resultados se ha planteado, en gran parte, la presente Memoria. Para ello se han elegido pollos de aproximadamente dos semanas de edad ya que, en esta etapa del desarrollo, se han eliminado los posibles efectos inhibidores del propio colesterol sobre las enzimas hepáticas. En efecto, los valores controles de las actividades HMG-CoA reductasa y PPMVA descarboxilasa obtenidos en hígado a los 19 dias de desarrollo embrionario son enormemente bajos, de acuerdo con la inhibición de ambas actividades enzimáticas y de la propia ruta colesterogénica por el colesterol acumulado en hígado, preferentemente en forma esterificada y procedente de la yema (411,383). Durante el desarrollo postnatal, ambas enzimas hepáticas aumentan marcadamente su actividad llegando a estabilizarse hacia los 10-12 dias de vida (362,411). En estas condiciones el estudio del posible efecto inhibidor de la fenilalanina y metabolitos relacionados puede resultar mucho más conveniente que en el desarrollo embrionario, cuando ambas enzimas se encuentran ya inhibidas.

En cuanto a las enzimas de cerebro, si bien la PPMVA descarboxilasa muestra un máximo muy acusado de su actividad alrededor del día 19 de desarrollo embrionario (411), sus niveles no varían marcadamente después de la eclosión. Algo semejante, aunque con variaciones aun menos acusadas, le ocurre a la HMG-CoA reductasa de cerebro (362,430). Por todo ello nos pareció aconsejable realizar este trabajo utilizando pollos de 1-2 semanas en los que, por otra parte, ya había finalizado prácticamente la mielinización pero en los que fuera posible poner de manifiesto una inhibición por la fenilalanina y derivados.

Estudios "in vitro"

Trabajos previos de Shah y col. (430) habían puesto de manifiesto "in vitro" una inhibición de la incorporación de MVA a lípidos insaponificables en homogenados de hígado y cerebro por concentraciones crecientes de fenilalanina a partir de 1.5 mM. Algunos de los derivados de la fenilalanina como los ácidos fenilpirúvico, fenilactico y fenilacetico presentaban el mismo efecto aunque más acusado, mientras que la tirosina no afectaba a la formación de insaponificables (431).

Años más tarde, Ranganathan y Ramasarma (106) hicieron un estudio intensivo del efecto de diferentes compuestos fenólicos y fenólicos sobre la síntesis de esteroides en hígado a partir de MVA, poniendo de manifiesto que, usando el sobrenadante post-nuclear como preparación enzimática (incluyendo por tanto mitocondrias) la fenilalanina 8 mM prácticamente no inhibía la incorporación de MVA mientras que la tirosina a la misma concentración producía una inhibición del 84%. Los ácidos fenilacetico, fenilpirúvico, p-hidroxifenilacetico y p-hidroxifenilactico a la misma concentración 8 mM ejercían un mayor efecto inhibitorio próximo al 90%. La contradicción frente a los resultados de Shah en relación al efecto de la tirosina intentaba ser explicada sobre la base de la utilización de diferentes preparaciones enzimáticas, con o sin mitocondrias y a la existencia o no de aceptores de cetoácidos en dichas preparaciones. Sin embargo, la controversia se encontraba abierta, y no solo en cuanto al efecto de la tirosina, sino en general a la influencia de distintos radicales sobre la síntesis de compuestos insaponificables "in vitro". Así, por ejemplo, la presencia de grupos hidroxilos en el anillo tenía efecto variable; el fenilpirúvico era un inhibidor más

potente que el p-hidroxi - fenilpiruvico mientras que a nivel de los ácidos cinámico y p-hidroxi-cinámico ocurría lo contrario. En cualquier caso, la inhibición parecía tener lugar en un paso comprendido entre el mevalonato y el isopentenil pirofosfato.

Estudios posteriores llevados a cabo por Bhat y Ramasarma (108) en hígado de rata establecieron asimismo que diversos compuestos fenólicos y fenilicos producían una inhibición de la enzima PPMVA descarboxilasa, mientras que los resultados obtenidos a nivel de la MVA cinasa y la PMVA cinasa eran mucho más contradictorios. En general los compuestos con estructura fenil-vinilica eran más inhibidores.

Como antes se ponía de manifiesto, en la presente Memoria se ha pretendido hacer un estudio intensivo del efecto de la fenilalanina y de los derivados que se acumulan anormalmente en estados de fenilcetonuria, independientemente de su estructura, sobre las enzimas que intervienen en el metabolismo del mevalónico, en un intento por hacer confluir líneas de trabajo fisiológicas o patológicas con otras de tipo puramente químico. En este sentido se ha ampliado el campo de los compuestos investigados, habiéndose ensayado comparativamente el efecto de la fenilalanina, fenilpiruvico, fenilacetico, fenilactico, o-hidroxi - fenilacetico, p-hidroxi fenilacetico, p-hidroxi - fenilactico y feniletilamina, alguno de los cuales no había sido aun investigado en ningún origen. Por otra parte el estudio se ha llevado a cabo en en todos los casos en hígado y en cerebro, siendo en este órgano la primera vez que se acomete tal estudio tan ampliamente.

Como fase preliminar de nuestro trabajo, se ha determinado la estabilidad de las enzimas implicadas en la fosforilación y descarboxilación del MVA cuando se conservan a 4°C y a -4°C. El mantenimiento de las preparaciones enzimáticas, (sobrenadantes de 105.000 x g) a 4°C ha puesto de manifiesto que la PPMVA descarboxilasa es mucho mas inestable que la MVA cinasa y PMVA cinasa, tanto en preparaciones de hígado como de cerebro, ya que al cabo de 24 o 48 h, respectivamente, pierde parte de su actividad. Sin embargo, el mantenimiento de las preparaciones enzimáticas a -4°C no produce pérdida de actividad en ninguna de las enzimas y orígenes estudiados durante 168 h, lo cual constituye una enorme ventaja con vistas a la conservación de las preparaciones tras su obtención.

Las primeras experiencias sobre inhibición se llevaron a cabo en presencia de fenilpiruvico a una concentración de 2.5 mM. La elección de este primer agente se hizo atendiendo a la bibliografía existente, que lo mostraba unánimemente como uno de los inhibidores de la incorporación de MVA y dado su acumulo en casos de fenilcetonuria. La presencia directa del fenilpiruvico durante el tiempo que duraban las reacciones enzimáticas producía una clara inhibición de la descarboxilasa mientras que ambas cinasas no parecían afectarse de una manera significativa. Estos resultados se obtuvieron tanto en hígado como en cerebro. Sin embargo, si las preparaciones enzimáticas se mantenían previamente durante 20 min. en presencia del fenilpiruvico, la inhibición observada en la descarboxilasa era muy superior en ambos órganos.

Con objeto de perfilar aun más el efecto de la preincubación, se llevaron a cabo experiencias en las que las preparaciones enzimáticas de hígado y de cerebro se mantuvieron 10 o 20 min. en presencia del fenilpiruvico, lograndose resultados muy semejantes en ambos casos. Por ello, en experiencias posteriores se usó siempre un tiempo de preincubación de 10 min.

El efecto de la preincubación había sido previamente reseñado por Bhat y Ramasarma en su trabajo citado (108). Sin embargo, estos autores no lograron observar ninguna diferencia significativa en la inhibición de la descarboxilasa de hígado de rata por ácido p-cumárico con o sin preincubación durante 5, 10 o 15 min. mientras que la PMVA cinasa solo era significativamente inhibida tras 5 min. de preincubación, y lo era en un mismo grado tras 10 o 15 min.

Por otra parte, estas mismas experiencias fueron realizadas en presencia de fenilpiruvico a distintas concentraciones (2.5-10.0 mM) poniendose de manifiesto una inhibición creciente de la PPMVA descarboxilasa a medida que aumenta la concentración del inhibidor, mientras que en ningún caso se afectan la MVA cinasa ni la PMVA cinasa.

Una vez seleccionado el tiempo de preincubación a utilizar y teniendo en cuenta que una concentración 10 mM de inhibidor era muy superior a la que podía obtenerse en condiciones patológicas, se realizó un estudio individualizado del efecto de la fenilalanina y sus derivados antes mencionados, a concentraciones 1.25-5,00

mM, sobre las tres actividades enzimáticas también reseñadas. Este estudio pormenorizado ha constituido gran parte de las experiencias "in vitro" y sus resultados (Tablas 12-27) nos han permitido establecer el papel de los distintos efectores ensayados tanto sobre las preparaciones enzimáticas de hígado como las de cerebro.

De la comparación de los distintos resultados obtenidos puede deducirse, en primer lugar, que la inhibición ejercida "in vitro" por cada inhibidor sobre la PPMVA descarboxilasa es mayor en el caso de la enzima de cerebro que en la de hígado, salvo en el caso de la propia fenilalanina, que es ligeramente más efectiva sobre la descarboxilasa hepática. En algunas ocasiones, como en el caso del ácido fenilactico y de la feniletilamina, solo se produce inhibición de la enzima de cerebro, mientras que la de hígado no resulta modificada significativamente. Este aspecto de nuestros resultados es sumamente interesante, ya que si bien se había descrito la inhibición de la enzima hepática por alguno de los metabolitos ensayados, nunca se había estudiado su posible acción a nivel de la enzima de cerebro, órgano en el que anormalmente se van a acumular en condiciones de fenilcetonuria clásica o experimental tales metabolitos. El diferente comportamiento de la descarboxilasa hepática y cerebral no solo se pone de manifiesto a concentraciones elevadas de metabolito (5.00 mM) sino también, en la mayoría de los casos, a concentraciones muy inferiores (2.50 mM, e incluso 1.25 mM).

Por otra parte de las ocho sustancias ensayadas, el ácido fenilpiruvico es el inhibidor más potente, especialmente en el caso de la enzima hepática, mientras que en la descarboxilasa de cerebro el grado de inhibición producido por este compuesto es semejante al logrado por el p-hidroxi-fenilactico y casi del mismo orden que el ejercido por el o-hidroxi-fenilacetico y el fenilacetico. La destacada potencia inhibidora del fenilpiruvico sobre la descarboxilasa hepática de pollo contrasta con los resultados previamente obtenidos por Bhat y Ramasarma (108) quienes describen un grado de inhibición semejante (alrededor del 30%) para el fenilpiruvico, fenilactico, p-hidroxi-fenilacetico y casi semejante al del p-hidroxi fenilactico, ensayados cada uno de ellos a una concentración 2.5 mM.

En cuanto a una posible relación entre estructura química y grado de inhibición de la PPMVA descarboxilasa, nuestros resultados no contribuyen a aclarar la

controversia existente, ya que ninguno de los inhibidores por nosotros ensayados presenta estructura fenilvinilica, supuestamente más inhibidora que la exhibida por la cadena lateral tipo piruvato, lactato o acetato (108). Así mismo, la presencia de un grupo hidroxilo parece afectar poco significativamente al grado de inhibición producido, ya que este es semejante en los casos de fenilacetico, o-hidroxi - fenilacetico y p-hidroxi fenilacetico, por una parte, si bien parece ser ligeramente superior en el p-hidroxi-fenillactico frente al fenillactico, todo ello con respecto a la descarboxilasa hepática, mientras que en la enzima de cerebro el mayor efecto inhibitor del p-hidroxi fenillactico frente al fenillactico aparece de una manera más patente.

Un último aspecto creemos interesante resaltar de estos resultados. Ninguno de los metabolitos a cualquiera de las concentraciones ensayadas (1.25-5,00 mM), presenta efecto inhibitor ni activador significativo sobre la MVA cinasa ni sobre la FMVA cinasa. Ambas cinasas tanto hepáticas como cerebrales se muestran así insensibles frente a sustancias que ejercen una marcada inhibición de la enzima que cataliza la reacción inmediatamente posterior del metabolismo del MVA, corroborando en esta forma la importancia que este último paso, el catalizado por la enzima PPMVA descarboxilasa, parece tener en la regulación de la colesterogenesis y no solo en circunstancias normales, sino también en condiciones patológicas como las derivadas de un acumulo anormal de los metabolitos estudiados.

Una vez demostrado "in vitro" el diferente efecto inhibitor ejercido individualmente por la fenilalanina y por algunos de sus derivados sobre la descarboxilación del PPMVA, se ha estudiado el efecto de una mezcla de todos ellos en la que cada una de ellos se encontrara a una concentración muy inferior a las previamente estudiadas (0.25 mM) pero cuyos efectos podrian superponerse entre si. Pretendiamos de este modo tratar de imitar "in vitro" las condiciones que se dan "in vivo" en estados de fenilcetonuria clasica, en los que las concentraciones de cada uno de los metabolitos acumulados son inferiores a las ya estudiadas. Utilizando una mezcla de este tipo, se ha ensayado su efecto sobre las dos enzimas principalmente reguladoras de la colesterogenesis, la HMG-CoA reductasa y la PPMVA descarboxilasa. Los resultados obtenidos en ambas enzimas confirman lo anteriormente expuesto: el grado de inhibición es muy

superior en las enzimas de cerebro que en las de hígado, corroborandose de esta manera la importancia de una inhibición en la colesterogenesis cerebral por los metabolitos acumulados en el propio cerebro en estados de fenilcetonuria, inhibición que puede tener consecuencias altamente peligrosas en las etapas cruciales del proceso de mielinización.

El estudio comparativo del efecto de la mezcla ensayada sobre ambas actividades enzimáticas pone también de manifiesto que el grado de inhibición de la HMG-CoA reductasa en ambos órganos es mayor que el ejercido sobre la PPMVA descarboxilasa. Este aspecto es de gran interés, no solo por haber sido la primera vez que se demuestra que la reductasa es inhibida por sustancias de esta naturaleza, sino también porque la diferencia en el grado de respuesta de ambas enzimas frente a esta situación es semejante a la obtenida frente a otras circunstancias más o menos fisiológicas como puedan ser la suplementación de colesterol (383,384,432,433) o colestiramina (383) a la dieta, el ayuno (384,433), etc.

Estudios "in vivo"

La segunda parte de la presente Memoria Doctoral ha estado dedicada a estudiar "in vivo" el efecto de una hiperfenilalaninemia experimental inducida en pollos de 1-2 semanas de vida sobre las enzimas de la colesterogenesis previamente mencionadas. Para ello, el primer problema a resolver consistió en obtener animales hiperfenilalaninémicos que pudieran ser usados como modelos experimentales con elevado grado de semejanza con las circunstancias patológicas típicas de la fenilcetonuria.

Hasta el momento, han sido muchos los modelos experimentales propuestos con objeto de reproducir las condiciones clínicas características de esta enfermedad. La utilización de altas dosis de fenilalanina ha estado muy extendida (189,433,435) si bien tiene el inconveniente de que produce una fuerte hipertirosinemia, lo cual no ocurre en la fenilcetonuria. Con objeto de obviar este problema, se han utilizado diversos inhibidores de la fenilalanina hidroxilasa, solos o en combinación, como son la esculina (205), el antibiotico cotrimoxazol (436), o la p-cloro fenilalanina (196,204,206), o bien derivados de la fenilalanina como el fenilacetato (131). La inyección de fenilalanina y de p-cloro fenilalanina ha permitido el

mantenimiento de una elevada relación Fen/ Tir en plasma (437,438) pero la acción del inhibidor de la fenilalanina hidroxilasa no es específica, habiéndose demostrado que produce algunos efectos tóxicos (206).

Greengard propuso en 1976 (210) la utilización de otro análogo de la fenilalanina, la α -metil fenilalanina, como inhibidor de la hidroxilasa en ratas recién nacidas sin que se produjeran efectos tóxicos en el animal en crecimiento. Más recientemente, Brass y col. (439) han descrito que la suplementación de la dieta con un 0.5% de α -metil fenilalanina y un 3% de fenilalanina induce en ratas gestantes y en sus fetos una hiperfenilalaninemia prolongada, pero sin que se afecte la supervivencia pre o postnatal de los animales.

En nuestro Departamento habíamos logrado la inducción de una fenilcetonuria experimental en embrión de pollo entre 11-20 días de incubación mediante la inyección diaria de α -metil fenilalanina y de fenilalanina (159). Los problemas derivados de la inyección diaria (una o dos veces según el metabolito) han intentado ser obviados en el presente trabajo con pollos recién nacidos mediante la suplementación oral de las mencionadas sustancias. En este sentido, se han probado dos tipos de dietas. La que hemos llamado "dieta sólida" consistía en una dieta estándar suplementada con un 0.4% de α -metil fenilalanina y un 5% de fenilalanina. La "dieta líquida" consistía en la adición de un 0.8% de α -metilfenilalanina y un 10% de fenilalanina al agua de bebida de los animales. Ambas dietas fueron suministradas a los animales "ad libitum" durante diferentes tiempos, siendo estudiado el efecto que presentan sobre distintos parámetros considerados normalmente como índices del grado de hiperfenilalaninemia logrado o de sus consecuencias.

En primer lugar, se ha estudiado el efecto de ambas dietas sobre el peso corporal de los animales y el de hígado y cerebro después de dos periodos diferentes de tratamiento. En ambos casos, dichos tratamientos se comenzaron cuando los pollos tenían 5 días de edad prolongándose durante 4 días o bien durante 9 días, con lo que se manejaban respectivamente animales de 9 y 14 días de edad. El tratamiento más corto (4 días) solo produjo diferencias significativas en el hígado de los animales tratados con dieta sólida, mientras que el tratamiento más largo (9 días) redujo significativamente el peso corporal y el peso de hígado y de cerebro con ambos tipos de dietas. Estos resultados coinciden con los obtenidos

previamente en embrión de pollo (159) si bien en este caso también fueron necesarios 8 días de inyección para lograr disminución significativa de peso de cerebro e hígado, mientras que 1 y 5 días no eran suficientes para producir efectos significativos.

En otras especies animales se había observado una cierta microcefalia tras el tratamiento con fenilalanina (434) o fenilalanina junto a p-cloro fenilalanina (450) o fenilalanina junto a α -metil fenilalanina (114,156). Sin embargo, el tamaño reducido observado en el cerebro de individuos humanos con fenilcetonuria (451) no se sabe si es resultado de una interferencia directa de la fenilalanina en la síntesis de los componentes estructurales del cerebro o bien consecuencia indirecta de la limitada disponibilidad de aminoácidos necesarios para la síntesis proteica.

Uno de los parámetros más comúnmente utilizados como índice de hiperfenilalaninemia experimental es la relación Fen/ Tir. Nuestros resultados muestran valores elevados de dicha relación en plasma, hígado y cerebro, tras los diferentes tratamientos ensayados. Sin embargo, los valores más elevados se observan en plasma mientras que en hígado solo se logran incrementos muy moderados. En plasma, la dieta sólida produce un incremento de unas trece veces después de 9 días de tratamiento si bien a los 4 días el incremento era de cerca de 8 veces. La dieta líquida produce un incremento menor (10 veces a los 9 días) y mucho más lento que la dieta sólida. En cerebro e hígado el efecto de ambos tipos de dieta fue muy semejante, siendo superior en ambos casos a los 9 días de tratamiento. Estas modificaciones fueron originadas, en general, por aumentos en la concentración de fenilalanina, sin que se observaran diferencias significativas en la concentración de tirosina. Resultados semejantes fueron descritos en ratas inmaduras mediante este (157) u otros tratamientos (156).

La hiperfenilalaninemia tiene grandes efectos sobre los mecanismos de transporte individual de los diferentes aminoácidos. Sin embargo la situación real respecto a la concentración de aminoácidos en el S.N.C. de enfermos fenilcetonúricos es más compleja que la derivada de una simple deficiencia en los aminoácidos necesarios para la síntesis proteica (455), síntesis que, por otra parte, parece ser particularmente sensible a los cambios en los niveles endógenos de los aminoácidos (453,454) especialmente durante el periodo de desarrollo neonatal en

que la síntesis y movilización de proteínas es más activa en el cerebro que en otras etapas de la vida.

Se ha propuesto que altas concentraciones de fenilalanina en plasma inhiben la captura por el cerebro de metionina y leucina (153), leucina (110) o en general de los aminoácidos alifáticos de cadena ramificada (154), probablemente a través de la inhibición por la fenilalanina de un sistema de transporte común para estos aminoácidos. Ello podría explicar la disminución casi generalizada observada según nuestros resultados en la concentración de la mayor parte de aminoácidos en cerebro, mientras que en hígado los cambios son mucho menos significativos.

Por otra parte, se ha descrito un aumento de la concentración de glicina en cerebro después de diferentes tratamientos que conducen a una hiperfenilalaninemia (156,157,158) como consecuencia de la activación de fosfoserina fosfatasa, enzima que cataliza la conversión de fosfoserina en serina, principal precursor de la glicina cerebral (157,158,206,452). Nuestros resultados en este sentido coinciden claramente con los de la bibliografía, siendo prácticamente la glicina el único aminoácido cuya concentración aumenta significativamente en cerebro, en especial tras 9 días de tratamiento, si bien también aparecen ligeramente incrementados los niveles de serina.

En cualquier caso, las modificaciones producidas en pollos recién nacidos por la suplementación de fenilalanina y α -metil fenilalanina sobre la concentración de los diferentes aminoácidos, principalmente la fenilalanina y tirosina, están completamente de acuerdo con la mayoría de los trabajos anteriores, por lo que nuestro modelo experimental de hiperfenilalaninemia puede considerarse correcto para el estudio de las modificaciones metabólicas que concurren en la fenilcetonuria.

Con este objetivo, se han estudiado los niveles de actividad PPMVA descarboxilasa y HMG-CoA reductasa en hígado y cerebro de animales sometidos a tratamiento con dieta sólida y con dieta líquida, durante 4 y 9 días, comparándose con la actividad en pollos controles.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, en primer lugar, una clara inhibición de la PPMVA descarboxilasa en todas las condiciones estudiadas. como

ocurría "in vitro" aunque no de un modo tan acusado, el grado de inhibición parece ser mayor en cerebro que en hígado, corroborando la importancia que en su momento destacábamos de una inhibición de la colesterogénesis cerebral "in situ". Tanto la dieta sólida como la líquida presentan un efecto muy semejante, efecto que parece ser algo superior al cabo de los 9 días de tratamiento.

La inhibición de la descarboxilasa hepática en pollos recién nacidos contrasta con la ausencia de efecto puesta de manifiesto en trabajos anteriores en hígado de embriones (109). sin embargo, los niveles de actividad encontrados en embriones controles y tratados eran muy bajos, de acuerdo con una inhibición ejercida por el acumulo de colesterol que tiene lugar en el hígado durante el desarrollo embrionario del pollo (383), por lo que difícilmente se podía demostrar una inhibición sobre una enzima ya de por sí inhibida. Estas consideraciones demuestran el interés de la utilización de pollos recién nacidos, especialmente pasada la primera semana de vida, en que las actividades enzimáticas reguladoras de la colesterogénesis se han estabilizado, si bien el proceso de mielinización puede considerarse como prácticamente finalizado.

Algo semejante puede decirse respecto a la HMG-CoA reductasa. mientras que en hígado de embriones no se había observado modificación alguna en estados de hiperfenilalaninemia experimental (109), la enzima hepática de pollos de 9-14 días resulta francamente inhibida tras la suplementación oral (sólida o líquida) de fenilalanina más α -metil fenilalanina. Sin embargo, es interesante destacar que repetidamente se ha observado una inhibición muy fuerte al cabo de 4 días de tratamiento, disminuyendo el porcentaje de inhibición en animales a los que se había prolongado el mismo tratamiento durante 9 días. Este hecho es de difícil interpretación por el momento, siendo necesarias nuevas y diferentes experiencias para poder explicarlo. No obstante, en principio se puede sugerir la posible influencia de los cambios que en animales controles ocurren durante la primera semana después de la eclosión. En efecto, es conocido que los niveles de actividad hepática son prácticamente nulos o muy bajos durante el desarrollo embrionario (334) e incluso, durante los primeros 4-5 días de vida (383). Cuando tiene lugar la regresión del saco vitelino y, por lo tanto, la disminución del contenido en colesterol hepático, se produce un fuerte incremento de la actividad reductasa, que parece llegar a estabilizarse

hacia los días 9-10 de vida (383). Si en esta etapa, el pollo se encuentra sometido a la influencia de un nuevo inhibidor de la reductasa los niveles de dicha actividad pueden permanecer muy por debajo de lo que podría deberse a la propia inhibición, dando lugar aparentemente a un grado de inhibición muy superior al real, sumandose el efecto de una disminución de la actividad y el efecto de un bloqueo en la subida de los niveles controles. Este bloqueo se retrasaría como consecuencia de la dieta pero no se anularía, por lo que al cabo de 9 días de tratamiento, los niveles de actividad reductasa observados serían ya los debidos solo a la inhibición por dicha dieta. El hecho de que los valores en pollos controles sean muy semejantes en ambas edades (9 y 14 días respectivamente) y caigan dentro de los márgenes normales para esa edad, corrobora lo anteriormente expuesto.

Por otra parte, la ausencia en condiciones estandar de variaciones apreciables en la actividad reductasa de cerebro durante el desarrollo postnatal (383) estaría de acuerdo con la explicación anterior, ya que en este órgano el grado de inhibición producido es mayor al cabo de 9 días de tratamiento que el observado a los 4 días.

Queda aun un problema por resolver: ¿ se trata de una inhibición de la actividad enzimática o de una represión de la cantidad de proteína?. Para contestar a esta pregunta, es necesario conocer los niveles de proteína existentes en condiciones normales y los cambios que sufren estos niveles a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal. En este sentido van dirigidos parte de los trabajos que actualmente se llevan a cabo en nuestro Departamento, pero, independientemente de que se afecte la cantidad o la calidad de la proteína enzimática, lo que si es cierto es que los niveles de actividad HMG-CoA reductasa se encuentran francamente disminuidos en el hígado y en el cerebro de pollos a los que se les ha inducido una hiperfenilalaninemia experimental, con las consecuencias que de ello se derivan sobre la biosíntesis del colesterol en ambos órganos.

Consideraciones finales

Los resultados recogidos en la presente Memoria Doctoral tras una serie de experiencias "in vitro" e "in vivo" ponen de manifiesto de una manera inequívoca que al menos dos de las principales enzimas implicadas en la regulación de la biosíntesis del colesterol son inhibidas

por la fenilalanina y por los diferentes metabolitos de ella derivados que se acumulan anormalmente en cerebro en estados de fenilcetonuria. La inhibición se produce a nivel de la HMG-CoA reductasa y de la PPMVA descarboxilasa, por lo que el proceso de colesterogenesis, en su conjunto, debe verse profundamente afectado. Si se tiene en cuenta que la inmensa mayoría del colesterol que es necesario para una correcta mielinización tiene que ser sintetizado en el propio cerebro durante las primeras etapas del desarrollo, se podrá comprender la importancia que una inhibición de la colesterogenesis cerebral puede tener para el normal desarrollo de dicho órgano. La hipomielinización debida a una deficiente síntesis de colesterol puede ser, por lo tanto, una de las principales causas del retraso mental característico de la oligofrenia fenilpiruvica.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- Como fase preliminar del trabajo, se ha demostrado que la enzima PPMVA descarboxilasa de hígado y de cerebro de pollo de 15 días es más inestable frente a la temperatura que la MVA cinasa y PMVA cinasa, ya que pierde parte de su actividad al ser conservada a 4°C durante 24-48 horas, mientras que ambas cinasas se conservan inalteradas hasta 72 horas. Las tres enzimas mantienen su actividad si son conservadas a -4°C hasta 168 horas.

2.- La preincubación de las preparaciones enzimáticas de hígado y de cerebro de pollo en presencia del ácido fenilpiruvico 2.5 mM como agente inhibidor aumenta considerablemente la inhibición de la PPMVA descarboxilasa. La preincubación durante 10 o 20 minutos produce un efecto semejante. Tanto la MVA cinasa como la PMVA cinasa no se ven afectadas en ninguna de las condiciones anteriores.

3.- La comparación de los resultados obtenidos "in vitro" sobre la PPMVA descarboxilasa por acción de la fenilalanina y sus derivados fenilpiruvico, fenilacetico, fenilactico, o-hidroxi - fenilacetico, p-hidroxi - fenilacetico p-hidroxi - fenilactico y feniletilamina pone de manifiesto que el efecto inhibidor de cada uno de ellos es superior en la enzima de cerebro que en la de hígado, salvo en el caso de la fenilalanina que es ligeramente más efectiva sobre la descarboxilasa hepática.

4.- El ácido fenilactico y la feniletilamina solo inhiben a la descarboxilasa de cerebro, mientras que la enzima de hígado no resulta significativamente afectada:

5.- De las ocho sustancias ensayadas "in vitro", el ácido fenilpiruvico es el inhibidor más potente, especialmente en el caso de la enzima hepática, mientras que en la descarboxilasa de cerebro el grado de inhibición producido por este compuesto es semejante al logrado por el ácido p-hidroxi-fenilactico y casi del mismo orden que el ejercido por el o-hidroxi - fenilacetico y el

fenilacetico.

6.- Ninguno de los metabolitos, a cualquiera de las concentraciones ensayadas "in vitro" (1.25-5.00 mM) presenta efecto inhibitor ni activador significativo sobre la MVA cinasa ni sobre la PMVA cinasa, tanto en hígado como en cerebro.

7.- La mezcla de las ocho sustancias estudiadas, a concentración 0.25 mM cada una, produce una clara inhibición de las actividades PPMVA descarboxilasa y HMG-CoA reductasa. El grado de inhibición es muy superior en las enzimas de cerebro que en las de hígado y comparativamente superior en la reductasa que en la descarboxilasa.

8.- Se ha obtenido un modelo de hiperfenilalaninemia experimental en pollo de 1-2 semanas mediante la administración oral (en la comida o en la bebida) de fenilalanina y α -metil fenilalanina, un inhibidor de la fenilalanina hidroxilasa. El tratamiento durante 9 días redujo significativamente el peso corporal y el peso de hígado y de cerebro con ambos tipos de dietas. La relación Fen/ Tir en plasma, cerebro e hígado aumenta significativamente tras los diferentes tratamientos ensayados. La hiperfenilalaninemia produce ciertas modificaciones en las concentraciones de los restantes aminoácidos en plasma, cerebro e hígado, siendo particularmente destacable una disminución casi generalizada en cerebro, salvo en el caso de glicina y serina cuyos niveles aumentan ligeramente.

9.- En pollos hiperfenilalaninemicos se ha observado una clara inhibición de la PPMVA descarboxilasa y de la HMG-CoA reductasa. El grado de inhibición de la descarboxilasa parece ser ligeramente superior en cerebro que en hígado; mientras que la reductasa hepática aparece, al menos aparentemente, muy inhibida tras 4 días de tratamiento, disminuyendo el porcentaje de inhibición en animales a los que se había prolongado el tratamiento durante 9 días.

Conclusion final

Al menos dos de las principales enzimas reguladoras de la colesterogenesis, la HMG-CoA reductasa y la PPMVA descarboxilasa, son inhibidas por la fenilalanina y por los diferentes metabolitos de ella derivados que se acumulan anormalmente en cerebro en estados de fenilcetonuria, por lo que el proceso de colesterogenesis debe verse profundamente afectado en esta situación patológica.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- MOSS, A.R. and SCHOENHEIMER, R. (1940) Conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem.* 135, 415.
- 2.- GRAU, C.R. and STEELE, R. (1954) Phenylalanine and tyrosine utilization in normal and phenylalanine deficient young mice. *J. Nutr.* 53, 59.
- 3.- UDENFRIEND, S. and COOPER, J.R. (1952) The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 194, 503.
- 4.- KAUFMAN, S. (1957) Enzymic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 226, 511.
- 5.- KAUFMAN, S. (1958) A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 233, 931.
- 6.- KAUFMAN, S. (1963) The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 50, 1085.
- 7.- KAUFMAN, S. (1967) Metabolism of phenylalanine hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.* 242, 3934.
- 8.- BROWN, G.M. (1971) The biosynthesis of pteridines. *Adv. Enzymol.* 35, 35.
- 9.- GAL, E.M., NELSON, S.M., SHERMAN, A.D. (1978) Biopterin III: purification and characterization of enzymes involved in the cerebral synthesis of 7,8 dihydrobiopterin. *Neurochem. Res.* 3, 69.
- 10.- SHIMAN, R., AKINO, M., KAUFMAN, S. (1971) Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 246, 1330.

- 11.- FRIEDMAN, P.A.; KAPPELMAN, A.H., KAUFMAN, S. (1972) Partial purification and characterization of tryptophane hydroxylase from rabbit hindbrain. *J. Biol. Chem.* 247, 4165.
- 12.- LEEMING, R. J., BLAIR, J.A., GREEN, A., RAINE, D.N. (1976) Bipterin derivatives in normal and phenylketonuric patient after oral loads of l-phenylalanine, l-tyrosine and l-tryptophan. *Arch. Dis. Child.* 51, 771.
- 13.- LADU, B.N. and ZANNONI, V.G. (1967) Phenylketonuria and allied metabolic diseases. Ed. J.A. Anderson y K.F. Swaiman (USA Dept. of health, Education and Welfare children's Bureau, Washington) 193.
- 14.- LADU, B.N. (1967) Aminoacid metabolism and Genetic variation. Ed. W.L.Nyhan, Mc Graw-Hill Book Co. Inc, New york, 121.
- 15.- CLELAND, W. W. (1963) Kinetic of enzyme catalized reaction with two o more substrates or products. (I) nomenclature and rate equations. *Biochem. Biophys. Acta* 67, 104.
- 16.- KAUFMAN, S., FISHER, DB. (1970) Purification and some physical properties of Phenylalanine hidroxylyase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 245, 4745.
- 17.- SHIMAN, R., GRAY, DW., PATER, A. (1979) A simple purification of phenylalanine hydroxylase by substrate induced hydrophobic chromatography. *J. Biol. Chem.* 254, 11300.
- 18.- COTTON, R.G.H. (1971) Phenylalanine hidroxylyase of macaca irus: purification of two components of the enzyme. *Biochem Biophys. Acta* 235, 61
- 19.- AYLING JE., PIRSON WD., AL-JANABI JM, HELFAND GD. (1974) Kidney phenylalanine hydroxilase from man and rat. Comparison with the liver enzymes *Biochemistry* 13, 78.
- 20.- FRIEDMAN P. A., KAUFMAN, S. (1973) Some characteristic of partially purified human liver phenylalanine hydroxylase. *Biocim. Biophys.*

Acta 293, 56.

- 21.- CHOO, K.H., COTTON, R.G.H., DANSK, D.M. JENNINGS, J.G. (1979) Genetics of mammalian phenylalanine hydroxylase system. *Biochem. J.* 181, 285.
- 22.- TOURIAN, A. (1971) Activation of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta* 242, 345.
- 23.- FISHER, D.B., KIRWOOD, R., KAUFMAN, S. (1972) Rat liver phenylalanine hydroxylase an iron enzyme. *J. Biol. Chem.* 247, 5161.
- 24.- GILLAN, S.S., WOO, S.L.C., WOOLF, L.I. (1974) The isolation and properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver. *Biochem J.* 139, 731.
- 25.- WOO, S.L.C., GILLAN S.S., WOOLF, L.I. (1974) The isolation and properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver. *Biochem j.* 139, 741.
- 26.- WOOLF L.I. (1976) The isolation, properties and assay of phenylalanine hydroxylase from human and rat liver. *Biochem. Med* 16, 284.
- 27.- JECLLIĆCKI, E., KAUFMAN, S. and MILSTIEN, S. (1977) Partial purification and characterization of rat liver phenylalanine hydroxylase phosphatase. *J. Biol. Chem.* 252, 711.
- 28.- PARKER, C.E., BARRANGUER, I., NEW HOUSE, R.Y., and BESSMAN, S., (1977) Studies of de isoenzymes of phenylalanine hydroxylase in humans. *Biochem. Med.* 17, 8.
- 29.- HARRIS, H. (1975) The principles of the human biochemical genetics. 2 nd ed pp 78-84. Oxford, New York, North-Holland/ American Elsevier, Amsterdam.
- 30.- BARRANGER, J.A., GEIGER, P.J., HUZINGA and BESSMAN, S.P. (1972) Isoenzymes of phenylalanine hydroxylase. *Science*, 175, 903.
- 31.- WOMAK, M.; ROSE, W.C. (1934) Feeding experiments with mixture of highly purified aminoacids. VI. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth. *J. Biol. Chem.* 107, 449.

- 32.- GAULL, G.E., TALLAN, H.N., LAJTHA, A., RASIN, D. (1975) Pathogenesis of brain disfunction in inborn errors of aminoacid metabolism, in Gaull G.E. (ed). *Biology of Brain Dysfunction*. New York, Plenum Publishing Corp, vol 3, 47.
- 33.- BICKEL, H., GERRARD, J., HICKMANS, E.M. (1953) Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 2, 812.
- 34.- KOCH, R., BLASKOVICS, M., WENZ, E., FISHLER, K., SCHAEFFLER, G. (1974) Phenylalaninemia and phenylketonuria in Nyan,Wl (ed): *Heritable disorders of amino acid metabolism*. New York, John Wiley sons, Inc, 1109, 140.
- 35.- KAUFMAN, S: (1971) The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. *Adv. Enzymol.* 35, 245.
- 36.- AYLING, J.E., HELFAND, G.D. (1975) Effect of pteridine cofactor structure on regulation of phenylalanine hydroxylase activity in Pflieger W (ed): *Chemistry and Biology of Pteridines* New York, Walter de Gruyter, 304.
- 37.- SHIMAN, R:, GRAY, D.W. (1980) Substrate activation of phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 255, 4793.
- 38.- DONLON, J., KAUFMAN, S., (1977) Modification of the multiple forms of rat hepatic phenylalanine hydroxylase by in vitro phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 78, 1011.
- 39.- DONLON, J., KAUFMAN, S. (1980) Relation ship between the multiple forms of rst hepatic phenylalanine hydroxylase and degree of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 255, 2146.
- 40.- DONLON, J., KAUFMAN, S., (1978) Glucagon stimulation of rat hepatic phenylalanine hydroxylase through phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* 253, 6657.
- 41.- FREEDLAND, R.A., KRAKOWSKI, M.C., WAISMAN, H.A. (1962) Effect of age, sex and nutrition on liver phenylalanine hydroxylase activity in rats. *AM J.*

Physiol. 202, 145.

- 42.- OHNO, T., TASAKI, I (1977) Relation between liver amino acid- catabolizing enzymes and free amino acids of liver and plasma in adult cockerels fed diets containing graded levels of protein. J. Nutr. 107, 829.
- 43.- TOURIAN, A: (1973) Phenylalanine hydroxylase activity in foetal hepatic organ culture. Biochem Biophys. Acta 309, 44.
- 44.- HAGGERTY, D., YOUNG, P.L., POPJACK, G., CARNES, W.H., (1973) Phenylalanine hydroxylase in cultured hepatocytes. I. Hormonal control of enzyme levels. J. Biol. Chem. 248, 223.
- 45.- TOURIAN A., (1976) Control of phenylalanine hydroxylase synthesis in tissue culture by serum and insulin, J. Cell. Physiol. 87, 15.
- 46.- GREENGARD, O., DEL VALLE J.A. (1976) The regulation of phenylalanine hydroxylase in rat tissues in vivo. substrate and cortisol induced elevations in phenylalanine hydroxylase activity.. Biochem. J. 154, 619.
- 47.- ZANNONI, V:G. and WEBER, W.W., (1966) Isolation and properties of aromatic -ketoacid reductase. J. Biol. Chem., 241, 1340.
- 48.- KAUFMAN, S., (1979) Biopterin and metabolic disease, in Kislivk RL, Brown GM (eds). chemistry and Biology of Pteridines, Developments in Biochemistry, Amsterdam, Elsevier North Holland Publishing Co 4, 117.
- 49.- ARMTRONG, MD y LOW N.L. (1957) Phenylketonuria (VIII) relation between age, serum phenylalanine level, and phenylpiruvic acid excretion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 142.
- 50.- BERRY, H.K., SUTHERLAND B.S., GUEST, G.M. and UNBARGER, B. (1958) Phenylalanine tolerance test on relatives of phenylketonuric children. Pediatrics, 21, 929.

- 51.- LIN E.C.C., RIVLIN, R.S. and KNOX W.E. (1959) Effect of wt. and sex on activity of enzymes involved in amino acid metabolism. Amer J. Physiol. 196, 303.
- 52.- FOLLING, A. Z. (1934) Uber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harm als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitat. Hoppe-Seyler's Z. Phisiol. Chem 227, 169.
- 53.- MOLDAVE, K., and MEISTER, A. (1957) Enzymic acylation of glutamine by Phenylacetic acid. J. Biol. Chem. 229, 463.
- 54.- TANIGUCHI, K and ARMSTRONG, M.D. (1963) Enzymic formation of o-hydroxyphenylacetic acid. J. Biol. chem. 238, 4091.
- 55.- TANIGUCHI, K., KAPPE, T. and ARMSTRONG, M.D. (1964) Phenylpyruvate oxidase- ocurrence of side chain rearrangement and comparison with p-hydroxy phenylpyruvate oxydase. J. Biol. Chem. 239, 3389.
- 56.- ARMSTRONG, M.D., SHAW, K.N.F. and ROBINSON, K.S. (1955) Phenylalanine and tyrosine requirements. J. Biol. Chem. 239, 3389.
- 57.- BICKEL, H., BACHMANN, C., BECKERS, R., BRAND, N.J., CLAYTON, B.E., CORRADO, G., FEINGOLD, H.J., GIARDIVI, G., HAMMERSE, G. and SCHONBER, D. (1981) Neonatal mass screening for metabolic disorders. Eur. J. Pediatr. 137, 133.
- 58.- GUTHRIE, R., SUSI, A. (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 32, 338.
- 59.- COMMITTEE FOR THE STUDY OF INBORN ERRORS OF METABOLISM, NATIONAL RESERACH COUNCIL. Genetic screening programs, principles and research, Washington, D.C., National Academy of Sciences, 21-93.
- 60.- JERVIS, G.A. (1953) Phenylpyruvic oligoprenia deficiency of phenylalanine oxidizing system. Proc. Soc. Exp. Biol. med. 83, 514.

- 61.- WALLACE, H.W., MOLDAVE, K and MEISTER, A. (1957) Conversion of phenylalanine to tyrosine in phenylpyruvic oligophrenia. Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 94, 632.
- 62.- KAUFMAN, S. (1958) Participation of tetrahydrofolic acid in the enzymic conversion of phenylalanine to tyrosine. Science, 128, 1506.
- 63.- FREIDMAN, P.A., FISHER, D.B., KANG, E.S. and KAUFMAN S. (1973) Detection of hepatic phenylalanine 4-hydroxylase in classical phenylketonuria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 552.
- 64.- KNOX W.E. (1972) Phenylketonuria in Stanbury J.B., Wyhgaarden J.B., Fredrickson DS (eds) The metabolic basis of inherited disease, ed 3. New York, MC Graw, Hill Book Co 266.
- 65.- BARTHOLOME, K, LUTZ, P., BICKEL, H. (1975) Determination of phenylalanine hydroxylase activity in patients with phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. Pediatr. Res. 9, 899.
- 66.- KANG, ES, KAUFMAN, S. GERALD P.S. (1970) Clinical and biochemical observations of patient with atypical phenylketonuria. Pediatrics 45, 83.
- 67.- KAUFMAN, S. HOLTZMAN, N.A., MILSTEIN, S.; BUTLER, I.R., KRUMHOLZ, A. (1975) Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. New Engl. J. Med. 293, 785.
- 68.- SMITH, I. (1974) Atypical phenylketonuria accompanied by a severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment. Arch. Dis. Child. 49, 245.
- 69.- LEEMING, R.J., BLAIR, J.A., REY, F. (1976) Biopterin derivates in atypical phenylketonuria. Lancet 1, 99.
- 70.- BARTHOLOME, K., BYRD, D.J., KAUFMAN, S. (1977) Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity in vitro. Pediatrics. 59, 757.

- 71.- KAUFMAN, S., BERLOW, S., SUMMER, G.K., MILSTEIN, S., SCHULMAN, J.D., ORLOF, S., SPIELBERG, S., PUESCHEL, S. (1978) hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. *New Engl. j. Med.* 299, 673.
- 72.- DANKS, D.M., BARTHOLOME, K., CLAYTON, B.E., CURTIUS, H., GROBE, H., KAUFMAN, S., LEEMING, R., PFLEIDERER, W., REMBOLD, H., REY, F., (1978) Malignant hyperphenylalaninaemia current status (June 1977). *J. Inherited Metab Dis.* 1, 49.
- 73.- CURTIUS, H.CH., NIEDERWIESER, A., VISCONTINI, M., OTTEN, A., SCHAUB, J., SCHEIBENREITER, S., SCHMIDT, H., (1979) Atypical phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency. Diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin and sepiapterin. *Clin. Chin. Acta* 93, 251.
- 74.- RENNERT, O, JULIUS, R., AYLSWORTH, A., WILLIAMS, L., GREER, M.(1971) A new disorders of phenylalanine metabolism associated with ataxia, convulsions and retardation. Combined abstracts, *Am Pediatr. Soc. Soc. Pediatr. Res. Atlantic City, NJ.*
- 75.- RENNERT, O: personal communication.
- 76.- KNOX, W.E. (1966) The metabolic basis of inherited disease. 3 ed, Ed, J.B. Stambury, J.B., Wyngaarden y D.S Fredrikson (Mc Graw-Hill Book Co, Inc, New York, 266.
- 77.- ALVORD, F.C., STEVENSON, L.D., VOGEL, F.S. and ENGLE R.L. (1950) Neuropathological findings in phenylpyruvic oligophrenia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 9, 298.
- 78.- MALAMUD, N. (1966) Neuropathology of phenylketonuria. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 25, 254.
- 79.- CROME, L. C. and STREN, J., Churchill pub (Lond) 265.
- 80.- SCHMIDT y FERNANDEZ MORAN.

- 81.- MOLINUEVO, M. L. y RODRIGUEZ- FERNANDEZ. (1980) "Factores que intervienen en el proceso de mielinización del sist. nerviosos central. Revista Clinica Española. Tomo 157, Num 6.
- 82.- BOGGS, J.M. Y MOSCARELLO M.A. (1978) Structural organization of the human myelin membrane. Biophys. Biochim. Acta. 515, 1.
- 83.- RAYLINGS, F.A., UZMAN, B.G. and VILLEGAS, G.M. (1977) Myelin In: Mammalian Cell Membranes, Jamieson G.A. y Robinson D.M. Eds. V. 2, 266.
- 84.- RAWLINS F.A. (1973) A time sequence autoradiographic study of the vivo incorporation of [1,2- H] cholesterol into peripheral nerve myelin. J. cell. Biol. 58, 42.
- 85.- SEROUG, N.E. and CHEVALLIER, F. (1974) Microscopic radioautography of adult brain cholesterol problem of the blood-brain barrier. Exp. Neurol. 44, 1.
- 86.- SZABO, G. (1974) Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability.. Nature 252, 47.
- 87.- PAPAHA DJOPOULOS D (1974) Cholesterol and cell membrane function a hypotesis concerning the etiology of atherosclerosis. J. Theor. Biol. 43, 329.
- 88.- RAWLINS, F.A. (1973) A quantitative electron microscopic analysis of myelination in the optic nerve of suckling rats treated with an inhibitor of cholesterol biosynthesis. Z. Zellforsch 140, 9.
- 89.- RAWLINS F.A. and UZMAN B.G. (1970) Retardation of peripheral nerve myelination in mice treated with inhibitors of cholesterol biosynthesis. J. Cell. Biol. 46, 505.
- 90.- KRITCHEUSKY, D., SHIRLEY, A.T., Di Tulio and HOLMES, W.L., (1965) Desmosterol in developing rat brain. J. Am. Chem. Soc. 42, 1024.

- 91.- RAWLINS F.A. y LOPEZ JIMENEZ C. (1979) Estudio comparativo de la mielina aislada de cerebros de ratas jovenes y adultas tratadas con un inhibidor de la biosíntesis del colesterol. Acta Cientifica Venezolana 30, 551.
- 92.- RAMSEY, R.B., JONES, J.P., RIOS, A. and NICHOLAS H.J. The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue. distribution in subcellular fractions as a function of time after intracerebral injection into developeing brain of [2- C] mevalonic. J. Neurochem. 19, 101.
- 93.- HIRANO, A., SAX, D.S. and ZIMMERMAN, H.M. (1969) The fine structure of the cerebella of jimpy mice and their "normal" litter males. Neuropath. neurol. 28, 388.
- 94.- FIRGARIA F.A. , COTTON R.G.H., DANKS.D.H. (1979) Dihydropteridine reductase deficiency diagnosis by assays on periheral blood-cells. Lancet, 2, 1260.
- 95.- DANKS D.M., SCHEINSINGER P, FIRGARIA, F, COTTON R.G.H. WATSON, B.M.BEMBOLD H. HENINIGS G. (1979) Malignant hiperphenylalaninemia featores biochemical findings and experience with administration of biopterines. Pediatr. Res 13, 1150.
- 96.- SCHAUB, J., DAUMLING, S; CURTIUS , NIEDERWIESER, A., BARTHOLOME, K., VISCONTINI, M., SCHIRCKS, B., BIERI, J.H. (1978) Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective dihydrobiopterin biosynthesis. Arch. Dis. Child 53, 674.
- 97.- NIEDERWIESER, A. CURTIUS, BETTONI, O:, BIERI., SCHIRCKS, B., VISCONTINI, M:; SCHAUB, J., (1979) Atypical phenylketonuria. Lancet 1, 131.
- 98.- KAUFMAN, S (1980) Differential diagnosis of variant forms of hyperphenylalaninaemia. Pediatrics. 65,840.
- 99.- SIDMAN, R.L., DICKIE, MM and APPEL S.H. (1964) Mutant mice (quaking and jimpy) with defficient myelination in the CNS. Science 144, 309.

- 100.- RAWLINS, F.A. and SMITH, M.E. (1971) A comparative study of central and peripheral nervous tissue. *J. Neurochem* 18, 1861.
- 101.- CROME, L., TYMMS V., ANDWOOLF, J.J. (1962) A chemical investigation of the defects of myelination in phenylketonuria. *J. Neurol. Neuroburg. Psychiatr.* 25, 143.
- 102.- FOOTE, J.L. Allen R.J., AGRANOFF, B.W. (1965) Fatty acids in esters and cerebrosides of human brain in phenylketonuria.
- 103.- GERSTL, B., MALAMUD, M ENG, L.F. and HAYMAN R.B. (1967) Lipid alterations in human brains in phenylketonuria. *Neurology* 17, 51
- 104.- SHAH, S.N. PETERSON, N.A. y McKEAN, C.M. (1970) Cerebral lipid metabolism in experimental hyperphenylalaninemia. Incorporation of C-labeled glucose into total lipids. *J. neurochem.* 17, 279.
- 105.- SHAH, S.N., PETERSON, N.A. y McKEAN, C.M. (1972) Impaired myelin formation in experimental hyperphenylalaninemia. *J. Neurochem* 19, 479.
- 106.- RANGANATHAN and RAMASARMA. (1973) Inhibition of the biosynthesis of sterols by phenyl and phenolic compounds in rat liver. *Biochem. J.* 143, 737.
- 107.- BOSCOOTT R.J. and BICKE, H. (1954) Detection of abnormal metabolites in the urine of phenylketonuria. *Biochem J.* 56.
- 108.- SHAMA BHAT, CH. and RAMASARMA T. (1979) Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase and mevalonate phosphatekinase by phenyl and phenolic compounds. *Biochem J.* 181, 143.
- 109.- ALEJANDRE, M.J., MARCO, C. GONZALEZ- PACANOWSKA, D., SEGDVIA, J.L., and GARCIA- PEREGRIN, E. (1983) Inhibition of brain pyrophosphomevalonate decarboxylase in experimental hyperphenyl alaninemia induced during myelination. *J.R.C.S. Med. Sci.* 11, 744.

- 110.- MITOMA and SE LEVALLEY (1973) Transport and incorporation of labeled compounds in experimental phenylketonuric rats. PSEBM. Proc. Soc. Exp. Biol. 144, 710.
- 111.- LONDON, Y., DENEL, R.A., GUERTS VAN VESSEL, W.S.M., VOSSENBERG, F.G.A., VAN DEENEN L.L.M. (1973) The protection of A myelin basic protein against the action of proteolytic enzymes after interaction of the protein with lipids at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta 311, 520.
- 112.- CHASE, H.P. and O'BRIEN, D. (1970) Effects of excess phenylalanine and of other aminoacids on brain development in the infant rat. Pediatric Research 4, 96.
- 113.- SPRINKLE, T.I. and RENNERT, O.M. (1976) The effect of phenylketonuric and other metabolites on sulfated galactocerebrosides synthesis in vivo and in culture. Journal of Neurochemistry 26, 499.
- 114.- JOHNSON R.C. and SHAH S.N. (1980) Effects of α -methylphenylalanine treatment during development on myelin in rat brain. Neurochemical Research 5, 7.
- 115.- GRUNDT, J., HOLE, K., (1971) Lipids and proteins in whole brain and in myelin of rats treated with p chloro- phenylalanine in the first weeks of life. Neurobiology, 1, 171.
- 116.- SHAH, N.A., PETERSON and MCKEAN (1972) Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. Journal of Neurochemistry 19, 2369.
- 117.- ALEJANDRE, M.J., MARCO, C., RAMIREZ, H., SEGOVIA, J.L. and GARCIA PEREGRIN, E. (1984) Lipid composition of brain myelin from normal and hyperphenylalaninemic chick embryos. Comp. Biochem. Physiol. (in press)
- 118.- HETHER and NEUHOFF, V., (1981) Use of α -methyl phenylalanine for studies of brain development in experimental phenylketonuria. J. Inher. Metab. Dis. 4, 67.

- 119.- LOO, Y.H., FULTON, T.R., HYDE, K.R., WISNIEWSKI, H.M. (1983/84) Biochemical indices of neuronal development in experimental phenylketonuria: High affinity transport systems and gangliosides. *Dev. Neurosci.* 6, 235.
- 120.- LOO, Y.H., SCOTTO, J., CHORING, M.C. (1977) Aromatic acid metabolites of phenylalanine in the brain of the hyperphenylalaninemia. *J. Neurochem.* 29, 411.
- 121.- HUTTENLOCHER, P.R. (1977) Synaptic and dendritic development and mental defect, in buchwald, brazier, brain mechanism in mental retardation. Academic Press, New York 123.
- 122.- NEIFACH, S.A. and SHAPOSHNIKOU, A.M. (1969) detection of heterozigous carrier of phenylketonurics. In Proceedings 5 th All-Union Congress of Neuropathologist and Psychiatrist. Moscow Ministry of Health, RSFSR 3, 54.
- 123.- HOGAN, R.N., COLEMAN, P.D. (1981) Experimental hyperphenylalaninemia: dendritic alterations in motor cortex of rat. *Expl. Neurol.* 74, 218.
- 124.- HOGAN, R.N., COLEMAN, P.D. (1981) Experimental hyperphenylalaninemia: dendritic alterations in cerebellum of rat. *Expl. Neurol.* 74, 234.
- 125.- ROBAIN, O., WEN, G.Y., WISHIEWSKI, H.M., SHEK, J.W., LOO, Y.H. (1981) Purkinje cell dendritic development in experimental phenylketonuria: a quantitative analysis. *Acta Neuripath.* 53, 107.
- 126.- LACEY, D.J. (1985) Normalization of dendritic spine number in rat hippocampus after termination of phenylacetate injections (PKU model) *Brain Res* 329 (1-2), 354.
- 127.- NIGAN, M.P., LABAR, D.R. (1979) The effect of hyperphenylalaninemia on size and density of synapses in rat neocortex. *Brain Res.* 179, 195.
- 128.- ROBAIN, O, WISHIEWSKI, H.M., LOO, Y.H., WEN, G.Y. (1983) Experimental phenylketonuria. effect of phenylacetate intoxication on number of synapses in the cerebellar cortex of the rat. *Acta*

Neuropath. 61, 313.

- 129.- BAUMAN, M.L., KEMPER, T.L. (1982) Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropath* 58, 55.
- 130.- FULTON, T.R., TRIANO, T., RABE, A., LOO, Y.H. (1980) Phenylacetate and the enduring behavioral deficit in experimental phenylketonuria. *Life Sci.* 27, 1271.
- 131.- LOO, Y.H., SCOTTO, J., WISNIEWSKI, H.M. (1978) Myelin deficiency in experimental phenylketonuria: contribution of the aromatic acid metabolites of phenylalanine. In *palo myelination and demyelination* pp. 453 (Plenum Press. New York.) *Adv. Exp. Med. Biol.* 100, 453.
- 132.- LOO, Y.H., FULTON, T.R., MILLER, K.A., WISNIEWSKI, H.M. (1980) Phenylacetate and brain dysfunction in experimental phenylketonuria: synaptic development. *Life Sci.* 27, 1283
- 133.- LOO, Y.H., FULTON, T.R., HYDE, K.R., WISNIEWSKI, H.M. (1984) Biochemical indexes of neuronal development in experimental phenylketonuria. high affinity transport systems and gangliosides. *Dev. neurosci.* (Basel) 6 (4-5), 227.
- 134.- LOO, Y.H., HOONG, E., POTENPSKA, A., WISNIEWSKI, H.M. (1985) A biochemical explanation of phenylacetate neurotoxicity in experimental phenylketonuria. *J. Neurochem.* 45(15), 1506.
- 135.- WEBER, G., GLAZER, R.I. and ROSS, R.A. (1970) Regulation of human and rat brain metabolism. inhibitory action of phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis, protein, lipid, DNA and RNA metabolism. *Advanc. Enzymic. Regulat.* 8, 13.
- 136.- GLAZER, R.I. and WEBER, G. (1970) Effect of l-phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis and glucose [6- H] incorporation in rat brain in vitro. *Fed. Proc.* 29.

- 137.- GLAZER, R.I. and WEBER, G. (1970) the effects of phenylpiruvate and hiperphenylalaninemia on incorporation of [6- H] glucose into macro molecules of slices of rat cerebral cortex. J. Neurochem in press.
- 138.- BOWDEN, J.A. and MCARTUR, C.L. (1972) Possible biochemical model for pheylketonuria. Nature, 235, 230.
- 139.- GLAZER, R.I., WEBER, G. (1971) The effects of l-phenyalanine and phenylpiruvate on glycolisis in rat cerebral cortex. Brain Research, 33, 439.
- 140.- AKIO ISHII, TAKASH DEGUCHI, HIRIFUTO MARUMO and MASAO TANAKA. (1981) Effects of N-(4-Methylbenzylthiocarbonil)- l-phenylalanine (KF 1492) a new phenylalanine derivate on lipid synthesis in vivo inhibition of hepatic cholesterolsynthesis and 3-hydroxy- 3-methyl glutaryl- CoA reductase. J. Pharm. dyn. 4, 933.
- 141.- LINNEWEH, F and ERLICH, M (1960) Klin Wschr, 38, 904.
- 142.- DRRUMMOND, K.N., MICHAEL, A.F., GOOD, R.A. (1966) Tryptophan metabolism in apatient with phenylketonuria and scleroderma proposed explanation of the indole defect in phenylketonuria. Canad. Med. ass. J. 94, 834.
- 143.- SCRIVER, C.R. (1967) Phenylketonuria and allied metabolic diseases. Ed J.A. Anderson y K.F. Swaiman (USA Dept. of health, Education, and Welfare, Children's bureau, Washington).
- 144.- PERRY, T.L., HANSEN, S., TISCHLER, B., BUNTING, R., DIAMOND, S. (1970) New Engl. J. Med. 282, 761.
- 145.- MCKEAN, C.M. and PETERSON, N.A. (1970) Neu Engl. J. Med. 283, 1364.
- 146.- SELMA, E., SNYDERMAN, N.D., CLAUDE SANSARICO, M.D., PATRICIA M. NORTON, A.B. and V. CASTRO J. (1981) Plasma and cerebrosplinal fluid amino acid concentrations in phenylketonuria during newborn period. The Journal of Pediatrics v.99, n.1, 63.

- 147.- EFRON, M.C., KANG, E.S., VISAKORPI, J., FILLER, F.X. (1969) Effect of elevated plasma phenylalanine levels and other aminoacid in phenylketonuria and normal subjets. *J. Pediatr.* 74, 399.
- 148.- LINMNEWEH, F., EHRLICH, M. (1962) Zur pathogenese des Schwachsims bei phenylalanimer. *Klin Wochenschr.* 49, 16.
- 149.- KARSTEN, R. h., KOEPP, P., PLETTNER, C., GRUTTNER, R. (1983) Plasma aminoacid pattern at noon in early treated hyperphenylalaninemic, phenylketonuric and normal children. *Ann. Nutr. Metab.* 27, 278.
- 150.- OLDENDORF, W.H. (1973). Saturation of blood brain barrier transport of amoniacids in phenyl ketonuric. *Arch. Neurol. (Chic)* 28, 45.
- 151.- MCKEAN, c.M., BOGGS, D.E. and PETERSON, N.A. (1968) Influence of high phenylalanine and tyrosine on the concs. of essential aminoacids in brain. *J. Neurochem.* 15, 235.
- 152.- PARDRIDGE, W.M. (1977) Kinetics of competitive inhibition of neutral aminoacids transport across de blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 28, 103.
- 153.- AGRAWAL, H.C., BONE, A.H. and DAVIDSON, A.N. (1970) Effect of phenylalanine on protein synthesis developing rat brain. *Biochem. J.* 117, 325.
- 154.- VAHVELAINEN, M.L. and OJA, S.S. (1975) Kinetic analysis of phenylalanine induced inhibition in the saturable influx of tyrosine, tryptophan, leucine and histidine into brain cortex slices from adult and 7 days old rats. *J. Neurochem* 24, 885.
- 155.- CLIFFOR, A., BRASS, CHARLES E ISAACS, RUTH MCCHESENEY and GREENGARD O. (1982) The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 16, 388.

- 156.- LANE, J.D. and NEUHOFF, V. (1980) Phenylketonuria clinical and experimental considerations revealed by the use of animal model. *Naturwissenschaften*. 67, 227.
- 157.- DIENEL, G.A. (1981) Chronic hyperphenylalaninemia produces cerebral hyperglycemia in immature rats. *J. Neurochem.* 36, 34.
- 158.- ISAACS, C.E. and GREENGARD, D. (1980) The effect of hyperphenylalaninemia on glycine metabolism in developing rat brain. *Biochem J.* 192, 441.
- 159.- MARCO, C., ALEJANDRE, M.J. ZAFRA, M.F., SEGOVIA, J.L., (1984) Induction of experimental phenylketonuria like conditions in chick embryo. Effect on aminoacid concentration in brain, liver and plasma. *Neurochem Int.* vol 6, num 4, 485.
- 160.- BERRY, H.K., BUTCHER, R.E., BRUNNER, R.R., BRAY, N.W., HUNT, N.M., WHARTON, C.H. (1977) Research to practice in mental retardation (P. Mitter Ed9 vol 3, 229. Univ. Park. Press. Baltimore/ London/ Tokio.
- 161.- PRATT, D.E. (1980) *J.Ment. Defic. res.* 24,203. Blood alanine as a regulatory aminoacid release from muscle in rats.
- 162.- HUETTER, G., KAUS, R. and NEUHOFF, V. (1985) Amino acid depletion in the blood and brain tissue of hyperphenylalaninemic rats is abolished by the administration of additional lysine: a contribution to the understanding of the metabolic defects in phenylketonuria. *biochemical medicine* 33, 334.
- 163.- KERR, G.R, WOLF, R.C. and WAISMAN, H.A. (1965) Hyperlipemia in infant monkeys fed excess l-histidine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 561.
- 164.- KERR, G.R., WOLF, R.C. and WAISMAN H.A. (1966) Symposia of zoological society of London. (RNTW Tiennes ed.) no. 17, 1371. Academic Press. London/New York.

- 165.- GEISON, R.L. and WAISMAN, H.A. (1970) Plasma and tissue cholesterol and lipid levels in rabbit on l-histidine supplemented diets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 234.
- 166.- SOLOMON, J.K. and GEISON R.C. (1977) Fed. Proc 36, 1157.
- 167.- ASAF, F, QURESHI, JIRAPA K. SOLOMON and BORR EICHELMAN. (1978) L-histidine induced facilitation of cholesterol biosynthesis in rats. Proceeding of the society for experimental Biology and Medicine. 159, 57.
- 168.- GRÜMER, H.D., MAINE, J. (1962) Med Assoc. 53, 8
- 169.- TASHIAN, R.E. (1961) Inhibition of brain glutamic acid decarboxilase by phenylalanine, valine and leucine derivs. ethiology of the neurological defect in phenylketonuric and branched chain ketonuria.
- 170.- PARE, C.M.B., SANDLER, M. y STACEY, R.S. (1957) 5- Hidroxy tryptamine deficiency in phenyl ketonuria. Lancet, 1, 551.
- 171.- BALDRIDGE, R.C., BOROFKY, L., BAIRD, H., REICHELE, F., BULLOCK, D. (1959). Relation of serum phenylalanine levels and ability of phenylketonurics to hydrolate tryptophan. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 529.
- 172.- MCKEAN, C.M., SCHANBERG, S.M., GIARMAN, N.J. Mechanism of the indole defect in phenylketonuria. Science, 137, 604.
- 173.- DAVISON, A.N., SANDLER, M (1958) Inhibition of 5-hydroxy triptophan decarboxilase by phenylalanine metabolites. Nature, 181, 186.
- 174.- BOGGS, D.E., ROSENBERG, R. and WAISMAN, H.A. effect on the offspring of female fed phenylalanine. Proc. soc. exp. Biol. med. 114, 356.
- 175.- WOOLLEY, D.W., VAN DER HOEVEN, T (1964) Science, 144, 1593. Serotonin receptors.

- 176.- ANDEN, N.E., CARLSON, A., HILLARD, N.A. and MAGNUSSON, N.A. (1964) 5-hidroxy triptamine release by nerve stimulation of the spinal cord. *Life sci.* 3, 473.
- 177.- BARASHNEV., V.V. KORNEICHUK, KLEMBOUSKY A.J., KLYUSHINA L.A. (1982) Role of the liver in the pathogenesis of cerebral disorders in phenylketonuria. *J. Inher. metab. Dis.* 5, 204. AUERBACH, V.H. WAISMAM, H.A. WICOFF, L.B. Liver arginase, histidase and phenylalanine transaminase following administration of their respective substrate. *Nature* 182, 871.
- 178.- DOLAN, G., GODIN, C. (1967) Phenylketonuria in rats. Model for biochem studies. *Nature*, 213, 916.
- 179.- GRANETT, S.E., WELLS, W.W. (1972) Energy metabolism in the brain of l-phenylalanine treated chicks. *J. Neurochem.* 19, 1089.
- 180.- WAISMAN, H.A., WANG, H.C., PALMER, G., HARLOW. H. and SPONHOLZ. (1960) Phenylketonuria. *Nature*, 188, 1124.
- 181.- LOUTTIT, R.T. (1962) Effects of phenylalanine diet. *J. Comp. Psychol.* 55, 425.
- 182.- GODIN, C. and DOLAN, G. (1966) Phenylalanine toxicity. *Biochim Biophys Acta* 130, 535.
- 183.- YUWILER, A., GELLER, E., (1969) Influence of mode and duration of phenylalanine administration on biochemical parameters in rat of various age. *J. Neurochem.* 16, 999.
- 184.- CASTELS, S., ZISCHKA, R. and ADDO, N. (1971) Alteration in composition of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, proteins and amino acids in brain of rats fed high and low phenylalanine diets. *Pediat. Res.* 5, 329.
- 185.- REED, P.B., WHITE, M.N. and LONGENECKER, J.B. (1970) Temporary induction of phenylketonuria like characteristic in infant rats: effect on brain DNA synthesis. *Nut. Report. Intern.* 2, 73.

- 186.- CLARKE, J.T.R. and LOWDEN, J.A. (1969) Hyperphenylalaninemia : effect on the developing rat brain. *Canad J. Biochem.* 47, 291.
- 187.- GEISON, R.L. and WAISMAN, H.A. (1970) Effect of nutritional status on rat brain maturation as measured by lipid composition. *J. Neurochem.* 17, 469.
- 188.- SHAH, S.N., MCKEAN, C.M., BOOGS and PETERSON, N.A. (1968) Influence of high phenylalanine and tyrosine on the concns of essential aminoacids in brain. *Fed. Proc.* 27, 488.
- 189.- PRENSKY, A.L., FISHMAN, M.A. and DAFTARI, B. (1971) Differential effects of hyperphenylalaninemia on the development of the brain in the rat. *Brain Research* 33, 181.
- 190.- SEARLE, A.G. (1952) *Heredity*, 6, 395.
- 191.- COLEMAN, D.L. (1960) Incorporation of glycine [1-C] into nucleic acids and proteins of mice with hereditary muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 30.
- 192.- DE GRAW, J.I., CORY, M., SKINNER, W.A., THEISEN, M.C. and MITOMA, C. (1967) Induced phenylketonuria (I) Inhibitors of phenylalanine hydroxylase. *J. Med. Chem.* 1110, 64.
- 193.- DE GRAW, J.I., CORY, M., SKINNER, W.A., THEISEN, M.C. and MITOMA, C. (1968) Induced phenylketonuria: (II) Potential inhibitors of phenylalanine hydroxylase. (III) Inhibitors of phenylalanine hydroxylase related to esculetina. *J. Med. Chem.* 11, 225.
- 194.- DE GRAW, J.I., BROWN, V.H., SKINNER, W.A., LE VALLEY, S. and MITOMA, C. (1972) Experimentally induced phenylketonuria. (II) Potential inhibitors of phenylalanine hydroxylase. *J. Med. Chem.* 15, 781.
- 195.- KOE, B.J.K. and WEISSMAN, A. (1966) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 154, 499.

- 196.- LIPTON, M.A., GORDON, R. GURROFF, G. and UDENFRIED, S. (1967) P-chloro phenylalanine induced chem manifestations of phenylketonuria. *Science*, 156, 248.
- 197.- GURROFF, G. (1969) Mode of action of p-chloro phenylalanine on *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 610.
- 198.- GAL, E.M., ROGGEVEEN, A.E. and MILLARD, S.A. (1970) DL- [2- C] p-chloro phenylalanine as an inhibitor of triptophan - 5-hydroxylase. *J. Neurochem*, 17, 1221.
- 199.- WEEITZMAN, E.D., RAPPORT, M.M., MCGREGOR G. and JACOBY, J. (1968) Sleep patterns of the monkey and brain serotonin concentration: effect of p-chloro phenylalanine. *Science*, 160, 1361.
- 200.- BERGER, R., SRINGER, J. and HOMMES, F.A. (1979) Brain protein and myelin metabolism in hyperphenylalaninemic rats. *Cellular and Molecular Biology* 26, 31.
- 201.- HOMMES, F.A., ELLER, A.G., TAYLOR, E.M. (1982) Turnover of the fast components of myelin and myelin proteins in experimental phenylketonuria. *Journal of Inheritable Metabolic Diseases* 5, 21.
- 202.- GRUNDT I.K., HOLE, K. (1974) P-chloro phenylalanine treatment in developing rats: protein and lipids in whole brain and myelin. *Brain research* 74, 269.
- 203.- SHILLITO, E.E. (1970) Effect of p-chloro phenylalanine on social interaction of male rate. *Brit. J. Pharmacol.*, 38, 305.
- 204.- LOO, Y.H. and MACK, K.J. (1972) Effect of hiper phenylalaninemia on vitamin B metabolism in developing rat brain. *J. Neurochem.* 19, 2385.
- 205.- VALDIVIESO, F., GIMENEZ, C. and MAYOR, F. (1975) *Biochem. Med.* 12, 72.
- 206.- DELVALLE J.A., DIEWEL, G. and GREENGARD, O. (1978) Comparison of -methyl phenylalanine and p-chloro phenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninemia in developing rats. *J.*

Biochem 170, 449.

- 207.- KELLY, C.I. and JHONSON, T.C. (1978) Effects of p-chloro phenylalanine and -methyl phenylalanine on amino acid uptake and protein synthesis in mouse neuroblastoma cells. J. Biochem. 174, 931.
- 208.- LANE, J.D., SCHONE, B., LANGENBECK, V. and NEUHOFF, V. (1979) Characterization of experimental phenylketonuria. In F.A. Hommes (ed) Models for the study of inborn errors of metabolism. Elsevier/ North Holland. Biomedical Press, armsterdam, 141.
- 209.- LANE, J.D., SCHONE B., LANGENBECK, V and NEUHOFF, V (1980) Characterization of experimental phenylketonuria. Augmentation of hyperphenylalaninemia with -methyl phenylalanine and p-chloro phenylalanine. Biocim. Biophys Acta 627, 114.
- 210.- GREENGARD, O., YOSS, M.S. and DEL VALLE, J.A. (1976) -methyl phenylalanine a neu inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. Science 192,1003.
- 211.- LANE, J.D. and NEUHOFF, V. (1980) Phenylketonuria, Clinical and experimental considerations revealed by the use of animal models. Naturwissenschaften 67, 227.
- 212.- JHONSON, R.C., SHAH, S.N. (1980) Effect of -phenylalanine treatment during development on myelin in rat brain. Neurochemical Research vol 5, no 7
- 213.- GREENGARD, O. and CLIFFORD A. BRASS. (1984) Development changes of cerebral phenylalanine uptake from severely elevated blood levels. Neurochemical research vol 9, no 6.
- 214.- GLICK, S.D. and GREENGARD, O. (1980) Exaggerated cerebral latealization in rats after early postnatal hypaerphenylalaninemia. Brain Research 202, 243.

- 215.- PATRICIA A. BINEK, TERRY C. JHONSON and CHESTER J. KELLY (1981) Effect of α -methyl phenylalanine and phenylalanine on brain polyribosomes and protein synthesis. *Journal of Biochemistry* 36 (4), 1476.
- 216.- HOWARD TAYLOR, E. and HOMMES, F.A. (1983) Effect of experimental hiperphenylalaninemia on myelin metabolism at later stages of brain development. *Inter. J. Neuroscience* vol 20, 217.
- 217.- JHONSON, R.C. and SHAN, S.N. (1984) Effect of hyperphenylalaninemia induced during suckling on brain DNA metabolism in rats pups. *Neurochemical Research* vo 9, no 4.
- 218.- ANGELIN, B. (1977). Cholesterol and bile acid metabolism in normo- and hyperlipoproteinaemia. *acta Med. Scand., Suppl.* 610, 1.
- 219.- CHEVALLIER, F. (1956) L'espace cholestérol du rat. *Arçg. Sci. Physiol.* 10, 249.
- 220.- CHEVALLIER, F. et GIRAUD, F. (1966) Renouvellements par transfert du cholesterol chez les rats adultes et en croissance. *Bull Soc. Chim. Biol.* 48, 787.
- 221.- MATHE, D and CHEVALLIER, F (1980) Fatros determing the biotranformation of cholesterol to bile acids in the rat. *Development of a new model. Digestion* 20, 121.
- 222.- CHEVALLIER, F. (1967) Dynamics of cholestérol in rats studies by the isotopic equilibrium method. *Adv. Lipid Res.* 5, 109.
- 223.- TREADWELL, C.R. and VAHOUNY, G.V. (1968) Cholesterol absorption. *Handbook of physiology* 3, 1407.
- 224.- LUTTON, C. et CHEVALLIER, F. (1972). Analyse des stérols des contenus digestifs et des fèces du rat. *Biochim. biophys Acta* 260, 133.
- 225.- CHEVALLIER, F. et LUTTON, C. (1972) Mouvements des sterols dans le tube digestif d'un rat. Absorption du cholesterol de synthèse, *Biochim Biophys acta* 274, 383.

- 226.- 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 phytosterol. J. Nutr. 107, 1996.
- 227.- SIPERSTEIN, M.D., CHAIKOFF, I.L and REINHARD, W.O. (1952) C-cholesterol. V. Obligatory function of bile intestinal absorption of cholesterol. J. Biol. Chem 198, 115.
- 228.- CHEVALLIER, F. and VYAS, M. (1963) Les origines du cholestérol du chyle. Mise en évidence à l'aide de la méthode des indicateurs nucléaires. Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 253.
- 229.- CLEMENT, J. (1961) Les lipides intestinaux et fécaux chez le rat soumis pendant de longues périodes à un régime lipoprive. Arch. Sci. Physio. 15, 345.
- 230.- HATCH, F.T., ASO, Y., HAGOPIAN, L.M. and RUBINSTEIN, J.L. (1966) Biosynthesis of lipoprotein by rat intestinal mucosa. J. Biol. Chem. 241, 1655.
- 231.- CHEVALLIER, F. and MATHE, D. (1964) Destinée du cholestérol des chylomicrons, chez le rat. III. Mouvements de cholestérol 4- C entre les chylomicrons et la lymphe en le serum "in vivo". Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 509.
- 232.- CHEVALLIER, F (1960) Etude des origines des stérols fécaux du rat a l'aide d'indicateurs nucléaires. II. Détermination des quantités de stérols excrétés et sécrétés, et de la fraction du cholestérol des parois digestives renouvelé par transfert. Bull. soc. Chim. Biol. 42, 633.
- 233.- HAVEL, R.J., GOLDSTEIN, J.L., BROWM, M.S. (1980) In metabolic control and disease, P.K. Bound and L.E. rosenberg. Eds. (Saunders, philadelphia ed.8) p. 393
- 234.- BROUWM, M.S. and GOLDSTEIN, J.L., (1985) Mundo Cientifico. Enero, 30

- 235.- MAHLEY, R.W., HUY, D.Y., INNERARITY, T.L., WEISGRABER, K.H. (1981) J. Clin. Invest. 68 85) 1197.
- 236.- BROWN, M.S. GOLSTEIN, J.L. (1974) Familial hipercholesterolemia. Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblast associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme a reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 788.
- 237.- GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1976) In current topics in cellular regulation. vol II, 147, Academic press.
- 238.- ANDERSON R.G.W. (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor bound low density lipoprotein in human fibroblast. cell, 10, 351.
- 239.- ORCI, L, CARPENTIER, L., PARRELE, J.L., ANDERSON, R., GOLDSTEIN J., PERRELET, A., BROWN, M. (1978) Occurrences of low density lipoprotein receptors within large pits on the surface of human fibroblasts as demonstrated by freeze-etching. Exp. Cell. Res. 113, 1.
- 240.- BROWN, M.S., KOVANEN, P.T., GOLSTEIN, J.L. (1981) Science 212, 628.
- 241.- RUSSEL, D.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 7501.
- 242.- TALL, D.R., SMALL, D.M. (1978) N.Engl. J. Med. 299, 1232.
- 243.- GLONSET, J. A. and NORUM, K.R. (1973) Adv. Lipid. Res. 11, 1.
- 244.- DIETSCHY, J.M., WILSON, J.D. (1970) Regulation of cholesterol metabolism. N. Engl. J. Med. 282, 1128.
- 245.- SRERE, P.A., CHAIKOFF, I.L., TREITMAN, S.S. (1950) The extrahepatic synthesis of cholesterol. J. Biol Chem. 182, 629.

- 246.- POPJAK, G., BEECKMANS, M.L. (1950) Extrahepatic lipid synthesis. *Biochem. J.* 47, 233.
- 247.- GOULD, R.G., COOK, R.P. (1958) The metabolism of cholesterol and other sterols in animals organism. En "cholesterol" ed. by Cook, R.P., Academic Press, New York, 237.
- 248.- KRITCHEUSKY, D. (1958) Cholesterol. John Wiley Sons. New York.
- 249.- DIETSCHY, J.M., and WILSON, J.D. (1968) Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relatives rates of synthesis in various tissues and mechanism of control. *J. Clin. Invest.* 47, 166.
- 250.- DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1967) Effect of cholesterol feeding and fasting on sterols synthesis in seventeen tissues of the rat. *J. Lipid Res.* 8, 97.
- 251.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. (1979) Absolute rates of cholesterol synthesis in extrahepatic tissues measured with H-labeled water and C-labeled substrates. *J. Lipid. Res.* 20, 740.
- 252.- JESKE, P.J. and DIETSCHY, J.M. (1980) Regulation of rates of cholesterol synthesis "in vivo" in the liver and carcass of the rat measured using (H) water. *J. Lipid. Res.* 21, 364.
- 253.- TURLEY, S.D., ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. (1981) Rates of sterols synthesis and uptake in the major organs of the rat "in vivo". *J.Lipid. res.* 22, 551.
- 254.- CHEVALLIER, F and LUTTON, C. (1973) The intestine is the major site of cholesterol synthesis in the rat. *Nature New Biol* 242, 61.
- 255.- BHATTACHARYYA, A.K., CONNOR, W.E. and SPECTOR, A.A. (1972) Excretion of sterols from the skin of normal and hypercholesterolemic humans. Implication for sterol balance studies. *J. Clin. Invest.* 51, 2060.

- 256.- MIETTINEN, T.A. (1970) Detection of changes in human cholesterol metabolism. *Ann. Clin. Res.* 2, 300.
- 257.- DIETSCHY, S.M. and WILSON, S.D. (1970) regulation of cholesterol metabolism. *New Engl. J. Med.* 282, 1128-1138, 1179-1183, 1241-1249.
- 258.- REINKE, R.T. and WILSON, J.D. (1967) The mechanism of bile acid absorption into the portal circulation. *Clin. Res.* 15, 242.
- 259.- KAY, R.E. and ENTENMAN, C. (1961) Stimulation of taurocholic acid synthesis and biliary excretion of lipids. *Amer. J. Physiol.* 200, 855.
- 260.- BERGSTROM, S. and DANIELSSON, H. (1958) On the regulation of bile acid formation in the rat liver. *Acta Physiol. scand.* 43, 1-7.
- 261.- TENNENT, d.M., SIEGEL, H., ZANETTI, M.E. (1960) Plasma cholesterol lowering action of bile acid binding polymers in experimental animals. *J. Lipid. Res.* 1, 469.
- 262.- GRUNDY, S.M., HOFMAN, A.F., DAVIGNON, J. (1966) Human cholesterol synthesis is regulated by bile acids. *J. Clin. Invest.* 45, 1018.
- 263.- PLAYDOUST, M.R., LACK, L. and WEINER, J.M. (1965) Effect of intestinal resection on bile salt absorption in dogs. *Amer. j. Physiol.* 208, 363.
- 264.- MAYER, D. (1976) The circadian rhythm of synthesis and catabolism of cholesterol. *Arch. Toxicol.* 36, 267.
- 265.- ABELL, L.L., MOSBACH, E.H. and KENDALL, F.E. (1956) Cholesterol metabolism in the dog. *J. Biol. Chem.* 220, 527.
- 266.- WILSON, J.D. (1964) The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady state in the rat. the influence of dietary cholesterol. *J.Lipid Res.* 5, 409.

- 267.- WILSON, J.D. (1962) Relation between dietary cholesterol and bile acid excretion in the rat. *Amer. J. Physiol.* 203, 1029.
- 268.- LUTTON, G., MATHE, D. and CHEVALLIER, F. (1973) Vitesses des processus de chez la rat VI. influence de la ligature du cholédoque et de l'ingestion d'acides biliars on de cholestyramine. *Biochim. Biophys. acta.* 306, 483.
- 269.- CONNOR, W.E., WITIAK, D.T., STONE, D.B. and ARMSTRONG, M.L. (1969) Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *J. Clin. Invest.* 48, 1368.
- 270.- GORDON, H., LEWIS, B., EALES, L., and BROCK, J.F. (1957) dietary fat and cholesterol metabolism. Faecal elimination of bile acids and other lipids. *Lancet* 28, 1299.
- 271.- WILSON, J.D. and LINDSEY, C.A. (1965) Studies on the influence of dietary cholesterol on cholesterol metabolism in the isotopic steady state in man. *J. Clin. Invest.* 44, 1805.
- 272.- VLAHCEVIC, Z.R., GUSTAFSSON, J., SCHWARTZ, C.C., DANIELSSON, H., HALLORAN, G. and SWELL, L. (1980) In vivo studies of cholesterol degradation to bile acids in man. XIIIth International Conference on the Biochemistry of Lipids. May 26-28, Milan.
- 274.- BLOCH, K., BOREK, E. and RITTENBERG, D. (1946) Synthesis of cholesterol in surviving liver. *J. Biol. chem.* 162, 441.
- 275.- TAYLOR, G.B. (1970) control mechanism of cholesterol biosynthesis. *Arch. Pathol.* 90, 83.
- 276.- DANA, B., OTT, M.S., and PAUL CACHANE P.H.B. (1981) Biochemical controls of liver cholesterol biosynthesis. *the american Journal of Clinical nutrition* 34, October, 2295.
- 277.- NERVI, F.O. and DIETSBACHY J.M. (1975) Ability of six different lipoprotein fractions to regulate the rate of hepatic cholesterologenesis "in vivo".

- j. Biol. Chem. 250, 8704.
- 278.- BARICHELLO, A.W. and FEDOROFF, S. (1971) Effect of ileal bypass and alfalfa on hypercholesterolemia. Brit. J. Exp. path. 52, 81.
- 279.- SLAKEY, L.L., CRAIC, M.C., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESH, A.A., SUBBARAYAN, C. and PORTER, J.W. (1972) The effect of fasting, refeeding and time of day on the levels of enzymes effecting the conversion of -hydroxy- -methyl glutaryl coenzyme a to squalene. J. biol. chem. 247, 3014.
- 280.- GOULD R.G. and SWYRD, E.A. (1966) sites of control of hepatic biosynthesis. J. Lipid. Res. 7, 698.
- 281.- KRISHNAIAH, K.V., JOSHI, V.C. and RAMASARMA, T. (1967) Effect of dietary cholesterol and ubiquinone on isoprene synthesis in rat liver. Arch. biophys. 121, 147.
- 282.- WISS, O. (1976) Influence of a lipogenic diet on the cholesterol synthesis in rats "in vivo" Biochem. Biophys. Res. commun. 68, 350.
- 283.- TAKEUCHI, N., KOGA, M. and YAMAMURA, Y. (1978) Impairment of hepatic cholesterol synthesis from squalene and the function of hepatic sterol carrier protein system by aging. Exp. Gerontol. 13, 1.
- 284.- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L. and MITSCHELEN, J.J. (1976) Regulation of HMG-CoA reductase. Advances in Lipid Research, vol 14, 1-14. Ed by paoletti and Kritchevsky.
- 285.- EDMOND, J. and POPJACK, C. (1974) Transfer of carbon atoms from mevalonate to n-fatty acids. J. Biol. Chem. 249, 60.
- 286.- JANES, M.J. and KANDUTSCH, A.A. (1979) Interrelationships between dolichol and sterol synthesis in mammalian cell cultures. J. Biol. chem. 254, 8442.

- 287.- WILEY, M.H., HOWTON, M.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1979) sex difference in sterol and nonsterol metabolism of mevalonate. *J. Biol. Chem.* 254, 837.
- 288.- FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., SEARLE, O.L., MACHIDA, B.K. and DIPERSTEIN, M.D. (1980) Sex difference in human mevalonate metabolism. *J. Clin. Invest.* 66, 361.
- 289.- MIDDLETON, B., HATTON, J. and WHITTE, D.A. (1981) The control of sterol synthesis during development of rabbit mammary gland. *J. Biol. Chem.* 256, 4827.
- 290.- 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 mechanism. *Poultry. Sci.* 54, 1075.
- 291.- AGUILERA, J.A., LINARES, A., MARCO, C., ARCE, V., y GARCIA PEREGRIN E., (1984) *Am. Nutr. Metab.* 28, 342.
- 292.- SHAH, S. N. (1973) Regulation of hepatic synthesis from mevalonate in suckling and weaned rats. *Lipids* 8, 289.
- 293.- 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.
- 294.- ANDERSEN, J.M. and DIETSCHY, J.M. (1977) Regulation of sterol synthesis in 16 tissues of rats. I. Effect of diurnal light cycling, administration of chylomicrons and triton. *J. Biol. Chem.* 252, 3646.
- 295.- 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.
- 296.- SIMKO, V., NEMEC, R. and GINTER, E., (1970) Incorporation of acetate 1- C into liver cholesterol of rats subjected to prolonged

exercise. *Experientia* 26, 749.

- 297.- SKLAN, D. and BUDOWSKI, P. (1979) Cholesterol metabolism in the liver and intestine of the chick: effect of dietary cholesterol, taurocolic acid and cholestiramine. *Lipids* 14, 386.
- 298.- TURLEY, S.D. and WEST, C.E. (1976) Effect of cholesterol and cholestiramine feeding and fasting on sterol synthesis in the liver, ileum and lung of the guinea pig. *Lipids*, 11, 571.
- 299.- IDE, T., OKAMATSU, H. and SUGANO, M. (1978) Effects of dietary fats on the activity of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl -CoA reductase and sterol synthesis in the liver of fasted reled rats. *J. Nutr. sci. Vitaminol.* 24, 535.
- 300.- THOMPSON, J.R., BEITZ, D.C. and JACOBSON, N.L. (1977) Effect of dietary cholesterol and fallow on cholesterol synthesis in the castrated goat. *J. Nutr.* 107, 1632.
- 301.- REYNER, M.D., 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.
- 302.- SHEFER, S., HAUSER, R., LAPAR, V. and MOSBACH, E.H. (1973) Regulatory effects of sterols and bile acids on hepatic 3-hydroxy 3-mthyl glutaryl CoA reductase and cholesterol 7- hidroxylyase in the rat. *J. Lipid res.* 14, 573.
- 303.- NERVI, F.D. 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.
- 304.- DAVISON, A.N. (1965) Brain sterol metabolism. *Adv. Lipid res.* 3, 171.
- 305.- PATTERSON, J.D. and FINEAN, J.B. (1961) Ultracentrifugal fractionation of nerve tissue. *J. Neurochem.* 7, 251.
- 306.- JONES, J.P., NICHOLAS, H.J. and RAMSEY, R.B. (1975) Rate of sterol formation by rat brain glial and neurons "in vitro" and "in vivo". *J.*

Neurochem 24, 123.

- 307.- RAMSEY, R.B., JONES, J.P., NAQUI, 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.
- 308.- 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.
- 309.- DIETSCHY, J.M. and WILSON, J.D. (1968) Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relative rates of synthesis in various tissues and mechanism of control. *J. Clin. Invest.* 47, 166.
- 310.- PAOLETTI, R., GROSSI- PAOLETTI, E. and FUMAGALLI, R. (1969) In: *Handbook of Neurochemistry* pp. 196. ed. by Lajtha A. Plenum press. New York.
- 311.- MANDEL, P and BIETH, R., (1951) La repartition des diverses fractions lipidiques and cours du development du cerveau chez la rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33, 973.
- 312.- FISH, W. A., BOYD, J.E. and STOKES, W.M. (1962) Metabolism of cholesterol in the chick embryo. III. Localization and turnover of desmosterol. *J. Biol. Chem.* 237, 334.
- 313.- KRITCHEVSKY, D. and HOLMES, W.L. (1962) Occurrence of desmosterol in developing rat brain. *biochem. biophys res. Commun.* 7, 128.
- 314.- FUMAGALLI, R. and PAOLETTI, R. (1963) The identification and significance of desmosterol in developing human and animal brain. *life Sci.* 2, 291.
- 315.- 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.
- 316.- HINSE, C.H. and SHAH, S.N. (1971) Desmosterol reductase activity of rat brain during development. *J. Neurochem.* 18, 1989.

- 317.- ADAMS, C.W.M. and DAVISON, A.N. (1966) The form in which cholesterol occurs in the adult. C.N.S. J. Neurochem. 5, 293.
- 318.- ADAMS C.W.M. and DAVISON (1959) The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. J. neurochem 4, 282.
- 319.- JOHNSON, A.C., MCNABB, A.R. and ROSSITER, R.J (1948) Lipids of normal brain. Biochem J. 43, 573.
- 320.- VOLPE, J.J., HENNESSY, S.W. and WONG, T. (1978) Regulation of cholesterol synthesis in cultured glial and neuronal cells. Biochim. Biophys. acta 528, 424.
- 321.- RAMSEY, R.B., Jones J. P. and NICHOLAS, H.J. (1971) The biosynthesis of cholesterol and other sterols by brain tissue. distribution in subcellular fraction as a function of time after intracerebral injection of [2- C] mevalonic acid. J. Neurochem. 18, 1485.
- 322.- 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.
- 323.- SRERE, P.A., CHAIKOFF, J.L., TRETITMAN, S.S and BURNSTEIN, L.S. (1950) The extrahepatic synthesis of cholesterol. J. Biol. chem. 182, 629.
- 324.- KANDUTSCH, A.A. and SAUCIER, S.E. (1969) Regulation of sterol synthesis in developing brain of normal and jimpy mice. Arch Bioch. Biophys. 135, 201.
- 325.- KABARA, J.J. And OKITA, G.T. (1961) Brain cholesterol biosynthesis with selected precursors "in vivo". J. Neurochem 7, 298.
- 326.- CONNOR, W.E., JOHNSON, R. and LIN, D.S. (1969) Metabolism of cholesterol in the tissues and blood of the chick embryo. J. Lipid. Res. 10, 388.

- 327.- HO, K.J. 819769 Cholesterol content of various tissues of chickens with exogenous or endogenous hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nut.* 29, 187.
- 328.- HO, H.K. and TAYLOR, C.B. (1968) Comparative studies on tissue cholesterol. *Arch. Pathol.* 86, 585.
- 329.- CHOBANIAN, A.V., HOLLANDER, L.W., SULLIVAN, M and COLOMBO, M.J. (1962) Body cholesterol metabolism in man. I. The equilibration of serum and tissue cholesterol. *J. Clin. Invest.* 41, 1732.
- 330.- SRERE, P.A., CHAIKOFF, I.L., TREITMAN, S.S. and BURNSTEIN, L. (1950) The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J. Biol. chem.* 182, 629.
- 331.- DOBBING, J. and KERSLEY, J.B. (1963) The influence of early nutrition on brain cholesterol accumulation during growth. *J. Physiol.* 166, 34.
- 332.- SMITH, M.E (1963) The effect of fasting on lipid metabolism of the central nervous system of the rat. *J. Neurochem.* 10, 531.
- 333.- MARCO, C., ALEJANDRE, M.J., GONZALEZ- PACANOWSKA, D., SEGOVIA, J.L. and GARCIA -Peregrin, E. (1985) *Int J. Biochem.* 17, 271.
- 334.- MARCO, C., GONZALEZ- PACANOWSKA, D., LINARES, A. and GARCIA- PEREGRIN E. (1983) Evolution of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase and microsomal membrane fluidity throughout chick embryo development. *Neurochem. res.* 8, 711
- 335.- EDMON, J. (1974) Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. *J. Biol. Chem.* 249, 72.
- 336.- BUCKEY, B.M. and WILLIAMSON, D.H.. (1973) Acetoacetate and brain lipogenesis. development pattern of acetoacetyl- coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain. *Biochem. J.* 132, 653.
- 337.- PLEASURE, P., LICHTMAN, C., GASTMAN, S., LIEB, M., ABRMSKY, O. and SILBERBER, G. (1979) Acetoacetate and D- 8- -hydroxy butarate as

- precursors for sterols synthesis by calf oligodendrocytes in suspension culture: extramitochondrial pathway for acetoacetate metabolism. *J. Neurochem.* 32, 1447.
- 338.- WILLIAMSON, D.H. and BUCKLEY, B.M. (1973) The role of ketone bodies in brain development. In *Inborn errors of metabolism* pp. 81. Ed by Hommes F.A and Van den Berg C.J. Academic Press. London and New York.
- 339.- PATEL, M.S. and OWEN, D.E. (1977) Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J. Neurochem.* 28, 109.
- 340.- 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.
- 341.- NEHLIG, A., LEHR, P.R. and GAYET, J. (1978) utilization of 3-hydroxy butyrate by chick cerebral hemispheres during postnatal maturation. *Comp. Biochem. Physiol.* 61, 59.
- 342.- RODWELL, V.W., MCNAMARA, D.J. and SHAPIRO, D.S. (1973) Regulation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme a reductase. *Adv. Enzymol.* 38, 373.
- 343.- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L. and MITSCHELEN, J.J. 819769 Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 14, 373.
- 344.- BROWN, M.s., DANA, S.E. and GOLDSTEIN, J.G. (1973) Regulation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme a reductase activity in human fibroblast by lipoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 2162.
- 345.- KROME, W., BETTERIDGE, D.J. and Galton, D.J. (1979) Regulation on sterol synthesis in human lymphocytes evidence for post-transcriptional control by low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 574, 361.
- 346.- JOHNSTON, D., CAVENEE, W.K., RAMACHANDRAN, C.K. and HELNMYKOUYCH (1979) Cholesterol biosynthesis in a variety of cultured cells. Lack of correlation between synthesis and activity of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase

- caused by dexamethasone. *Biochim. Biophys Acta* 572, 188.
- 347.- GOLDFARB, S. (1972) Submicrosomal localization of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Febs Lett* 24, 153.
- 348.- MITROPOULOS, K.A., VENKATESAN, S., BALASUBRAMANIAN, S and PETERS, T.J. (1978) The submicrosomal localization of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, cholesterol 7-hydroxylase and cholesterol acyltransferase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 82, 419.
- 349.- BEG, Z.H., STONIK, J.A. and BREWER, H. (1982) Isolation and immunological characterization of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase from human liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107, 1013.
- 350.- TANAKA, R.D., EDWARDS, P.A., LAN, S.H., KNOPPEL, E. M. and FOGELMAN, A.M. (1982). Purification of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase from human liver. *J. Lipid Res.* 23, 523.
- 351.- FIEDD, F.J., ERICKSON, S.K., SHREWSBURY, M. and COOPER, A.D. (1982) 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase from rat intestine; subcellular localization and "in vitro" regulation. *J. Lipid Res.* 23, 105.
- 352.- KAWACHI, T. and RUDNEY, H. (1970) Solubilization and purification of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Biochemistry* 9, 1700.
- 353.- BROWN, M.S., DANA, S.E., DIETSCHY, J.M. and SIPERSTEIN, M.D. (1973) 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. Solubilization and purification of a cold sensitive microsomal enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 4731.
- 354.- HELLER, R.A. and GOULD, R.G. (1973) Solubilization and partial purification of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 50, 859.
- 355.- PHILPIP, B.W. and SHAPIRO, D.J. (1979) Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid*

Res 20, 588.

- 356.- RODWELL, V.W., NORDSTROM, J.L. and MITSCHELEN, J.J (1976). Regulation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Advances in Lipid Research* vol 14, 1. Ed by Paoletti and Kritcheusky.
- 357.- ARAGON, M.C., GIMENEZ, C., VALDIVIESO, F and MAYOR, F. (1978) Hydroxymethyl glutaryl CoA reductase (NADPH) activity in rat brain during development. *J. Neurochem.* 30, 649.
- 358.- MALTESE, W.A. and VOLPE, J.J. (1979) Activation of 3-hydroxy e-methyl glutaryl CoA rdeuctase in homogenates of developing rat brain. *Biochem J.* 182, 367.
- 359.- SUDJIC, M.M. and BOOTH, R. (1976) Activity of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase in brains of adult and 7 days old rats. *Biochem. J.* 154, 559.
- 360.- NESS, G.C., MILLER, J.P., MOFFLER, M.H., WOODS, L.S. and HARRIS, H.B. (1979) Perinatal development of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase :activity in rat lung, liver and brain. *Lipids* 14, 447.
- 361.- MCNAMARA, D.J., QUACKENBUSH, F.W. and RODWELL, V.W. (1972) Regulation of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase. Developmental pattern. *J. Biol. Chem.* 247, 5805.
- 362.- ALEJANDRE, M.J., RAMIREZ, H., SUAREZ, M.D., and GARCIA-PEREGRIN E. (1981) Different developmental patterns of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase in chick tissues according to their role in cholesterologenesis. *Biol. neonate* 40, 232.
- 363.- BEG, Z.H., ALLMAN, D:W. and GIBSON, D.M. (1973) Modulation of 3-hydroxy 3-mthyl glutaryl CoA reductase activity with CAMP and with protein fractions of liver cytosol. *Biochem. Biophys Res. comun* 54, 1362.
- 364.- GOODWIN, C.D. and MARGOLIS, S. (1973) Specific activation of "in vitro" cholesterol biosynthesis by preincubation of rat liver homogenates. *j.*

Biol. Chem. 248, 7610.

- 365.- BERNDT, J. and GAUMER, R. (1974) Evidence for an activating- inactivating system of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase in moese liver. Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem. 355, 905.
- 366.- BERNDT, J., HEGARDT, F.G., BOVE, J., GAUMERT, R., STILL, J. and CARDO, M.T. (1976) activation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase " in vitro' . Hoppe- seyler's. Z. Physiol. Chem. 357, 1277.
- 367.- SHAPIRO, D.J., NORDSTROM, J.L., MITSCHELEN, J.J., RODWELL, V.W. and Schinke, R.J. (1974) Microassay for 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reducuse in rat liver and in L-cell fibroblasts. Biochem. Biophys, Acta 370, 369.
- 368.- CHOW, J.C., HIGGINS, M.J. and RUDNEY, y (19759 The inhibitory effect of ATP on 3-hydroxy 3-mhetyl glutaryl CoA reuctase. Biochem. biophys res. Commun. 63, 1077.
- 369.- BROWN, M.S., BRUNSCHEDE, G.Y. and GOLSTEIN, J.L. (19759 Inactivation of 3-hydroxy 3-methyl gluatryl CoA reductase "in vitro". J. Biol. chem. 250, 2502.
- 370.- NORDSTRON, J.L., RODWELL, V.W. and MITSCHELEN, J.J. (1977) Interconversion of active and inactive forms of rat liver hydroxy methyl glutaryl CoA reductase. J. Biol. chem. 252, 8924.
- 371.- INGEBRITSEN, T.S., LEE, A., PARKER, R.A. and GIBSON, D.M. (1978) reversible modulation of the activities of both liver microsomal hydroxy methyl glutaryl CoA reductase and its inactivating enzyme. Evidence for the regulation by phosphorylation dephosphorylayion. Biocem. Biophys. Res. Commun. 81, 1268.
- 372.- VICKERS, J.d. and RATHBONE, M.P. (1979) The effects of membrane cholesterol depletion upon erythrocyte membrane bound enzymes. Can. J. Biocem. 57, 1144.

- 373.- BEG, Z.H., STONICK, J.A. and BREWEER, H.G. (1979). Characterization and regulation of reductase kinase, a protein kinase that modulates the enzymic activity of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4375.
- 374.- GIBSON, D.M., PARKER, R.A., STEWARD, C.S and EVENSON, K.J. (1982) Short term regulation of HMG-CoA reductase by reversible phosphorylation: Modulation of reductase phosphatase in rat hepatocytes. Adv. Enzyme Regul. 20, 263.
- 375.- BEG, Z.H. and STONIK, J.A. (1982) reversible inactivation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, reductase kinase and mevalonate kinase are separate enzymes. Biochem. Biophys. res. Commun. 108, 559.
- 376.- AVIGAN, J. and BEG, Z.H. (1982) Regulation by reversible phosphorylation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase (HMGR) in human skin fibroblasts. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 41, 1400.
- 377.- BEG, Z.H., STONIK, J.A. and BREWER, H.B., Jr (1984a) Human hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme a reductase. evidence for the regulation of enzymic activity by a bicyclic phosphorylation cascade. biochem. Biophys res. commun. 119, 488.
- 378.- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. and DIETSCHY, J.M. (1979) Active and inactive form of HMG-CoA reductase in the liver of the rat. J. Biol. chem. 254, 5144.
- 379.- KIMELBERG, H.K. and PAPAHAADJOPOULOS 819749 Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on (Na + K) stimulated adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 249, 1071.
- 380.- NAITO, M. (1978) effects of cholesterol and cholesterol ester on cell function. 1. Incorporation of tree cholesterol and cholesterol

oleate into the cell membrane and its effect on membrane fluidity, membrane fragility and DNA synthesis. *Cell. Struct. funct.* 3, 219.

- 381.- SABINE, J.R. and JAMES, M.J. (1976) The intracellular mechanism responsible for dietary feedback control of cholesterol synthesis. *Life Sci.* 18, 1185.
- 382.- MITROPOULOS, K.A., VENKATESAN, S. and BALASUBRAMANIAN, S. (1978) Compartmentation and supply of cholesterol: two important factors in the coordinate regulation of hydroxy methyl glutaryl CoA reductase and cholesterol 7-hydroxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 6, 878.
- 383.- ALEJANDRE, M.J., RAMIREZ, H., SEGOVIA, J.L. and GARCIA PEREGRIN, E. (1985) Effect of dietary cholesterol and cholestiramine on developmental pattern on 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase. *Ann. Nutr. Metab.* 29, 111.
- 384.- RAMIREZ H., ALEJANDRE, M.J., ZAFRA, M.F., SEGOVIA, J.L. and GARCIA PEREGRIN, E. (1984) relationship between inhibition of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase by cholesterol feeding and short-term changes in membrane fluidity during neonatal development. *Int. J. Biochem.* vo. 6, no.3, 291.
- 385.- IDE, T., OKAMATSU, H. and SUGANO, M. (1978) Regulation by dietary fats on 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coa reductase in rat liver. *J. Nutr.* 208, 601.
- 386.- BAQUIR, Y.A. and BOOT, R. (1977) The effect of dietary cholesterol on rat liver microsomal 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase activity. *Biochem. Soc. Trans.* 5, 294.
- 387.- SHAPIRO, D.J. and RODWELL, V.W. (1971) Regulation of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 246, 3210.
- 388.- EDWARDS, P.A. (1975) Effect of plasma lipoproteins and lecithin cholesterol dispersions on the activity of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase of isolated hepatocytes. *Biochem.*

biophys. acta. 409, 39.

- 389.- EDWARDS, P.A., FOGELMAN, A.M. and POPJACK, G. (1976) A direct relationship between the amount of sterol lost from rat hepatocytes and the increase in activity of HMG- CoA reductase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 68, 64.
- 390.- FOGELMAN, A.M., EDMOND, J., SEAGER, J. and POPJACK, G. (1975) Abnormal induction of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase in leukocytes from subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 250, 2045.
- 391.- EDWARDS, P.A., POPJACK, G., FOGELMAN, A.M. and EDMOND, J. (1977) Control of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase by endogenously synthesized sterols "in vitro" and "in vivo". *J. Biol. Chem.* 252, 1057.
- 392.- BROWNS, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (1979) Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3330.
- 393.- GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1977) The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Am. Rev. Biochem.* 46, 897.
- 394.- BROWN, M.S., DANA, S.E. and GOLDSTEIN, J.L. (1974) Regulation of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase activity in cultures human fibroblasts, comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249, 789.
- 395.- 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.
- 396.- BROWN, M.S., FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L., KANEKO, I. and ENDU, A. (1978) Induction of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase activity in human fibroblast incubated with compactin (ML-236-B) a competitive inhibitor of the reductase. *J. Biol. Chem.* 253, 1121.

- 397.- 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.
- 398.- FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1979) Squalene synthetase activity in human fibroblast regulation via the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5018.
- 399.- BORTZ, W.M. (1968) Nor adrenalin induced increase in hepatic cholesterol synthesis and its blockade by puromycin. *Biochim. Biophys. Acta* 152, 619.
- 400.- DUGAN, R.E., NESS, G.C., LACKSAMANAN, M.R., NEPOKROEFF, C.M., PORTER, J.W. (1974) Regulation of hepatic 3-hydroxy methyl glutaryl CoA reductase by the interplay of horms. *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 499.
- 401.- NESS, G.C., DUGAN, R.e. (1973) Stimulation of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reuctase activity in hyPOSECTOMIZED rats by 1-triiodo thyronine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3839.
- 402.- BROWN, M.S. and GOLSTEIN, J.L. (11974) Suppression of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reuctase activity and inhibition of growth of human fibroblast 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 249, 7306.
- 403.- KANDUTSCH, A.A. and PAKIE R.M. (1970) Comparison of the effects of some C, C-steroids and 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 122.
- 404.- DUGAN, R.E., NESS, G.C., LAKSHMAN, M., RETAL, M. (1974) Regulation of hepatic 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase by the interplay of hormones. *Arch. Biochem. Biophys.* 61, 499.
- 405.- LEVY, H.R. and POPJAK, G. (1960) Biosynthesis of cholesterol and mevalonic kinase and phosphomevalonic kinase from liver. *Biochem. J.* 75, 417.

- 406.- DORSEY, J.K. and PORTER, J.W. (1968) The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 243, 4667.
- 407.- BEYTIA, E., DORSEY, J.K., CLELAND, W.W. and PORTER, J.W. (1970) Purification and mechanism of action of liver mevalonic kinase. *J. Biol. Chem.* 245, 5450.
- 408.- RAMACHANDRAN, C.K. and SHAH, S.N. (1977) Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase γ developing rat brain. *J. Neurochem.* 28, 751.
- 409.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D., GARCIA-MARTINEZ, J. and GARCIA PEREGRIN, E. (1981) Brain phosphorylation decarboxylation of mevalonic acid in the neonatal chick. *Enzyme* 26, 136.
- 410.- GARCIA-MARTINEZ, J., SEGOVIA, J.L., SUAREZ, M.D. and GARCIA PEREGRIN, E. (1976) Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 72, 202.
- 411.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D., AGUILERA, J.A., ARCE, V., GARCIA MARTINEZ, J., LINARES, A. and GARCIA PEREGRIN, E. (1985) Studies of the diurnal rhythm of mevalonate metabolism by sterol and nonsterol pathways and of mevalonate activating enzymes. *Int. J. Biochem.*, vol 17, no. 2, 275.
- 412.- 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.
- 413.- JABALQUINTO, A.M. and CARDEMIL, E. (1981) The effect of diabetes nutritional factors and sex on rat liver and kidney mevalonate kinase, mevalonate 5-phosphate kinase and 5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 132.

- 414.- GARCIA_MARTINEZ, J., LINARES, A., SUAREZ, M.D. and GARCIA PEREGRIN, E. (1982) Partial purification and properties of mevalonate kinase from neonatal chick liver. *Revista Española de Fisiología* 38, 261.
- 415.- MITCHELL, Jr. and AVIGNAN, J. (1981) Control of phosphorylation and decarboxylation of mevalonic acid and its metabolites in cultured human fibroblasts and in rat liver in vivo. *J. Biol. chem.* 256, 6170.
- 416.- CHANG, T. and LIMANEK, J.S. (1980) Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA synthase, 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxy cholesterol in chinese hamster ovary cell. *J. Biol. chem.* 255, 7787.
- 417.- HENNING, V., NOSLEIN, L.M. and LYNEN, F. (1959) Biosynthesis of terpenes. V. formation of pyrophosphomevalonic by phosphomevalonic kinase. *Arch. Biochem. Biophys* 83, 259.
- 418.- HELLING, H and POPJACK, G. (1961) Studies on the biosynthesis of cholesterol. XIII. Phosphomevalonic kinase from liver. *J. Lipid res.* 2, 235.
- 419.- SLAKEY, L.L., NESS, G.L., QURESHI, N. and PORTER, J.W. (1973) Occurrence of the enzymes affecting the conversion of acetyl CoA to squalene in homogenates of aorta. *J. Lipid res.* 14, 405.
- 420.- LINARES, A., GARCIA-MARTINEZ, J., SUAREZ, M.D. and GARCIA PEREGRIN, E. (1976) Mevalonate phosphorylation in the neonatal chick liver. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 72, 202.
- 421.- GONZALEZ-PACANOWSKA, MARCO, C., GARCIA MARTINEZ, J. and GARCIA PEREGRIN, E. (1986) Effects of different nutritional conditions on chick liver mevalonate-activating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 875, 605.
- 422.- SHAH, S.N. (1973) Regulation of hepatic cholesterol synthesis from mevalonate suchling and weaned rats. *Lipids.* 8, 284.

- 423.- DURR, J.F. (1968) Factors affecting the metabolism of mevalonate by adipose tissue. *comp. Biochem. Physiol.* 25, 663.
- 424.- BHAT, S.C. and RAMASARMA, T. (1977) Rhythmic activity of utilization of mevalonate for biogenesis of cholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785.
- 425.- JABALQUINTO, A.M. and CARDEMIL, E. (1980) Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis role of 5-pyrophospho mevalonate decarboxylase. *Lipids.* 15, 196.
- 426.- BHAT, S.C. and RAMASARMA, T. (1980) Purification and properties of mevalonate pyrophosphate decarboxylase of rat liver. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 19, 249.
- 427.- ALVEAR, M., JABALQUINTO, A.M., EYZAGUIRRE, J and CARDEMIL, E (1982) Purification and characterization of avian liver mevalonate- 5- pyrophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 21, 4646.
- 428.- 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-methyl gluaryl CoA reductase and cholesterol-synthesizing activity in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 21.
- 429.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDAL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 430.- SHAH, S.N., PETERSON, N.A. and McKEAN, C.M. (1968) Inhibition of in vitro sterol biosynthesis by phenylalanine. *Biochimica et Biophysica Acta.* 164, 604.
- 431.- SHAH, S.N., PETERSON, N.A. and McKEAN, C.M. (1969) Inhibition of sterol synthesis in vitro by metabolites of phenylalanine. *Biochemica et Biophysica Acta.* 187, 236.

- 432.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D., MARCO, D., GARCIA MARTINEZ, J. and GARCIA PEREGRIN, E. (1985) Role of mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase in the regulation on chick intestinal cholesterologenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 833, 449.
- 433.- GONZALEZ-PACANOWSKA, D., MARCO, C., GARCIA MARTINEZ, J., LINARES, A., GARCIA PEREGRIN, E. (1985) Feedback inhibition of mevalonate kinase, mevalonate 5-phosphate and mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase by cholesterol feeding. *Nutr. Rep. Int.* vol. 31, no 1, 121.
- 434.- CLARK, J.T.R. and LOWDEN, J.A. (1969) *Can.J. Biochem.* 47, 291.
- 435.- JHONSON, R.C. and SHAH, S.N. (1973) Effect of hyperphenylalaninemia on fatty acid composition of lipids of rat brain myelin. *J. Neurochem.* 21, 1225.
- 436.- DHONDT, J.L., DAUTEVAUX, M., BISERTE, G. and FARRIAUX, J.P. (1977) *Biochimie* 59, 713.
- 437.- DELVALLE, J.A. and GREENGARD, O. (1976) The regulation of phenylalanine hydroxylase in rat tissues in vivo. *Biochem. J.* 154, 613.
- 438.- SHAH, S.N. and JHONSON, R.C. (1978) Effect of postweaning hyperphenylalaninemia on brain development in rats: Myelination, lipid and fatty acid composition of myelin. *exp. Neurol.* 61, 370.
- 439.- BRASS, C.A., ISAACS, C.E., McCHESNEY, R. and GREENGARD, O. (1982) The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 16, 388.
- 450.- NORDYKE, E.L. and ROACH, M.K. 819749 Effect of hyperphenylalaninemia on amino acid metabolism and compartmentation in neonatal rat brain. *Brain Res.* 67, 479.
- 451.- PAINE, R.S. (1957) The variability in manifestation of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics* 20, 290.

- 452.- DALY, E.C., NADI, N.S. and APRISON, M.H. (1976) Regional distribution and properties of the glycine cleavage system within the central nervous system of the rat. evidence for an endogenous inhibitor during the vitro assay. J. Neurochem. 26, 179.
- 453.- TUDBALL, N. and GRIFFITHS, R. (1976) Biochemical changes in brain of experimental animals in response to elevated homocystine and methionine, J. neurochem. 26, 1149.
- 454.- HUGHES, JV. and JOHSON, T.C. (1976) Hiperphenylalaninemia: effect on brain polyribosomes can be partially reversed bt other amino acids. Science 195, 402.
- 455.- SNYDERMAN, S.E. HOLT, L.E. Jr., NORTON, P.M. and ROITMAN, E. (1968) Effect of high and low intakes of individual amino acids on the plasma aminogram in Leathem JH editor: Prtein nutrition and free amino acids patterns, New Brunwick, N.J. Rutgers University Press, 19.

FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA

PRESIDENTE

Prof. Dr. D. Federico Mayor Zarco

VOCALES

Prof. Dr. D. Fernin Landuez Medina

Prof. Dr. D. Alberto Maduado

Prof. Dr. D. Dolores Suarez Ortega

SECRETARIO

Prof. Dr. D. Antonia Aramez

Reunido en el día de la fecha, el Tribunal constituido por los Catedráticos que al margen se expresan, acordaron conceder al presente trabajo de TESIS DOCTORAL, la calificación de Apto "Cum laude" quedando anotado al folio _____ del libro de Actas correspondiente, de todo lo cual como Secretario, doy fé.

Granada, 26 de Septiembre 1986

