

11261

RECIBIDO A las 10:30 AM del 10 de Mayo de 1986
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE LA DIOSGENINA

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)

presenta

MARCO ANTONIO JUAREZ DROPEZA

DEPTO. DE BIOQUIMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA 1986

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	<u>páginas</u>
INTRODUCCION.....	1-6
TRABAJO EXPERIMENTAL :	
<i>Materiales y métodos (resultados previos)</i>	7-10
<i>Manuscrito enviado a publicación</i>	11-34
Resumen.....	12
Introducción.....	13
Materiales y Métodos.....	14-16
Resultados y Discusión.....	17-31
Agradecimientos.....	32
Referencias.....	33-34
<i>Experimentos recientes</i>	35-47
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	49-50
REFERENCIAS.....	51-55

PROLOGO

El contenido de la presente tesis se encuentra dividido en cuatro secciones: Introducción, Trabajo experimental, Conclusiones y Perspectivas.

En la Introducción se contempla el papel fisiológico del colesterol, su obtención por la síntesis *de novo* y por la absorción intestinal del colesterol exógeno, así como la utilidad que puede tener el conocer los eventos moleculares de la absorción intestinal del colesterol mediante el uso de sustancias que han mostrado inhibir dicho proceso, en particular la diosgenina.

La parte central de la tesis queda constituida por el Trabajo experimental, que a su vez se subdivide en tres secciones: materiales y métodos (con resultados previos), el manuscrito enviado para publicación, y experimentos recientes.

En las Conclusiones se destacan las aportaciones hechas por los presentes experimentos.

Finalmente, en la sección de Perspectivas se plantea el valor de la diosgenina como "herramienta de trabajo" en el estudio del metabolismo del colesterol y la utilidad de caracterizar las propiedades cinéticas de las enzimas que lo esterifican, para evaluar su papel fisiológico en la absorción intestinal del colesterol y para conocer sus requerimientos estructurales.

TITULO : EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE LA DIOSGENINA

INTRODUCCION

Papel Fisiológico del colesterol

El colesterol es una molécula esteroidea ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos, se localiza principalmente en las biomembranas, donde ha mostrado tener propiedades de modificador de la "fluidez" y por lo tanto de regulador de algunas funciones asociadas con ella (e.g., permeabilidad a electrolitos y no electrolitos, actividad de enzimas membranales y sistemas de transporte), además, es también el precursor de otras moléculas importantes tales como la vitamina D, los ácidos biliares y las hormonas esteroideas (1, 2).

Aunque se ha demostrado que cualquier célula nucleada de mamífero es capaz de sintetizar colesterol, los sitios principales de su síntesis en el animal adulto son el hígado y el intestino delgado (1-3). Se ha descrito que el colesterol y otros productos isoprenoides juegan un papel crítico en el crecimiento de todas las células eucariotas, ejemplo de ello son los hallazgos de Srere, et al y de Kandutsch, et al (3,4), que muestran cómo los tejidos que se encuentran en constante renovación y/o crecimiento, tal como el cerebro de las ratas recién nacidas, sintetizan activamente al colesterol, mientras que el cerebro de animales adultos realiza la colesterogénesis a velocidades muy bajas o nulas (esto no significa que las demás vías metabólicas estén re-

primidas en los tejidos que dejan de proliferar). De tal forma, los tejidos con alta velocidad de proliferación como el intestino delgado muestran altos niveles de síntesis de colesterol y de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa, EC 1.1.1.34), que es el paso limitante de la velocidad de síntesis del colesterol. Por contraste tejidos como el riñón, que al presentar muy lento recambio celular, no sintetizan colesterol y tienen poca actividad de HMG-CoA reductasa. La única excepción a ésta generalización es el hígado del animal adulto, que a pesar de una baja proliferación celular, sintetiza activamente al colesterol (5). La primera evidencia de que la disminución de la síntesis del colesterol puede inhibir el crecimiento celular, fue aportada por el grupo de Chen (6), quienes demostraron que tratando a las células L del ratón con el 25-hidroxicoolesterol o con 20-hidroxicoolesterol, que inhiben a la HMG-CoA reductasa, podían bloquear el crecimiento y la proliferación de estas células. Estos hallazgos fueron confirmados y ampliados posteriormente por los grupos de Goldstein y Brown, de Chen y Endo, indicando que además del colesterol otros productos isoprenoides como el dolicol y la ubiquinona probablemente se requieren para el crecimiento celular (7-9).

Regulación de la síntesis del colesterol

Los estudios clásicos de Lynen, Popjak y Siperstein identificaron a la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa como el paso limitante de la velocidad de síntesis del colesterol por

el hígado. Cuando a un animal, como la rata, se le somete a una dieta deficiente en colesterol, la actividad de la HMG-CoA reductasa del hígado se incrementa al igual que la síntesis del colesterol. Por el contrario, cuando al mismo animal se le sujeta a una dieta rica en colesterol, la actividad de la HMG-CoA reductasa disminuye al igual que la síntesis del colesterol. El grupo de Goldstein y Brown amplió estas observaciones, ya que demostraron que también los tejidos extrahepáticos pueden regular la actividad de la HMG-CoA reductasa en respuesta al colesterol exógeno. Un ejemplo de estas células son los fibroblastos, que además de mostrar regulación de la HMG-CoA reductasa, pueden crecer fácilmente en condiciones de cultivo de tejidos. El uso de estas células permitió a estos investigadores estudiar en la célula íntegra la regulación de esta enzima y a su vez la regulación de la síntesis del colesterol (10).

Se sabe que existen dos proteínas importantes que regulan la disponibilidad del colesterol para la célula, el receptor para las lipoproteínas LDL y la enzima HMG-CoA reductasa. Ambas proteínas trabajan coordinadamente, ya que la deficiencia de este receptor se asocia a un incremento en la actividad de la HMG-CoA reductasa, mientras que un aumento en la función del receptor se traduce como una disminución en la actividad de la HMG-CoA reductasa (10). Un ejemplo claro de la importancia del buen funcionamiento del receptor de las LDL es el paciente con hipercolesterolemia familiar, que al poseer un receptor defectuoso para estas lipoproteínas, la HMG-CoA reductasa muestra una elevada activi-

dad. La regulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa es compleja y aún no se ha entendido completamente, pero se sabe que puede ser modulada rápidamente por modificación covalente (la enzima fosforilada es inactiva) y por modulación alostérica (un efector negativo es el NADP⁺, y un efector positivo es el glutatión), mientras que la regulación tardía se realiza por la síntesis de la enzima (11, 12).

Absorción intestinal del colesterol.

En la mayoría de las células existe un continuo recambio del colesterol, que como anteriormente se indicó, proviene del hígado y del intestino delgado por la síntesis *de novo* en ambos tejidos y por la absorción intestinal del colesterol exógeno o de origen dietario y del endógeno, derivado de la bilis y de los *detritus* celulares.

Se pueden distinguir 3 pasos secuenciales en la digestión gastrointestinal de los lípidos:

- a) la emulsificación de las gotas lipídicas
- b) la hidrólisis enzimática de ésteres de los ácidos grasos en la interfase emulsión-agua.
- c) la dispersión de los productos lipídicos insolubles, en una forma absorbible (colesterol libre).

Con respecto a la absorción intestinal del colesterol, se sabe que su forma absorbible es la no esterificada (13-15), que se agrupa con los ácidos biliares y otros lípidos como los ácidos grasos libres y los fosfolípidos formando las llamadas micelas

mixtas (16), que pueden desempeñar cuando menos dos funciones:

- 1) vencer la capa de hidratación de las membranas plasmáticas de los enterocitos (17).
- 2) mediante los ácidos biliares (taurocólico principalmente) activar a la colesterol esterasa en la dirección de síntesis de ésteres de colesterol (18-20).

La última función puede ser limitante de la velocidad de absorción del colesterol, puesto que para mantener un gradiente de concentración, es necesario derivarlo hacia ésteres de colesterol, lo que explicaría el hecho de que el colesterol que es absorbido por el intestino delgado sufre una rápida esterificación antes de ingresar a la circulación linfática y portal, en donde es transportado por las lipoproteínas plasmáticas.

La contribución de cada una de las enzimas que esterifican al colesterol (colesterol esterasa y acil-CoA :colesterol O-acil transferasa) en el proceso de su absorción a nivel intestinal continúa siendo tema de debate (21-25).

Aunque se ha encontrado que algunos análogos del colesterol pueden inhibir su absorción intestinal, el mecanismo por el cual lo realizan no se conoce (26-29), pero se ha propuesto que junto con el colesterol pueden formar complejos no absorbibles o que compitan con el colesterol por los sitios de su absorción. La dilucidación de su mecanismo de acción puede, en alguna forma, contribuir a un mejor entendimiento del proceso de la absorción del colesterol.

El ser humano no posee la capacidad enzimática para degradar

el núcleo esteroidal, y cuando existe un desequilibrio entre la cantidad de colesterol que absorbe y/o sintetiza con el que puede eliminar, se puede producir una hipercolesterolemia, que por sí sola es un factor de riesgo coronario.

La disponibilidad de análogos del colesterol que poseen actividad hipocolesterolemia, ofrece la oportunidad de poder utilizarlos en la terapéutica clínica, pero desafortunadamente se desconoce cómo actúan. En particular, la diosgenina ha mostrado que inhibe la absorción intestinal del colesterol sin modificar la de los ácidos biliares. Si esta sapogenina compite con el colesterol por sus sitios de absorción, el esclarecimiento de su mecanismo de acción puede colateralmente ayudar a conocer parte de los eventos moleculares de la absorción intestinal del colesterol, por lo que es deseable conocer :

- a) si la rata puede absorber la diosgenina cuando se le administra por vía oral.
- b) cuál es la distribución tisular de la diosgenina que se absorbe.
- c) si la diosgenina puede ser metabolizada por el animal de experimentación.
- d) si la sapogenina puede interferir con la esterificación del colesterol por las enzimas intestinales.

Para contestar a las preguntas anteriores, se realizaron los experimentos que a continuación se presentan.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS.- El ácido taurocólico (de bilis de buey), PPO y dimetil-POPOP fueron obtenidos de casas comerciales. Los solventes orgánicos se redestilaron antes de ser utilizados.

Excepto el 25-hidroxicolesterol, todos los esteroides utilizados fueron repurificados por cromatografía en columna o en placa fina. Debido a que se ha mostrado que pequeñas variaciones en la estructura del colesterol pueden inducir diversos efectos en las enzimas involucradas en su metabolismo (e.g., 25-hidroxicolesterol inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa pero estimula a la ACAT), es importante estar seguros de la pureza de los compuestos utilizados para así conocer los efectos de cada esteroide. Por tal motivo, se utilizaron los siguientes criterios para evaluar la pureza de los esteroides: cromatografía en capa fina con varios sistemas de solventes, cromatografía de gases, espectroscopía en infrarrojo, punto de fusión y sólo en el caso de la diosgenina, espectroscopía de masas.

COMPUESTOS MARCADOS CON ISOTOPOS.- (1 α , 2 α (n)-³H) colesterol y (4-¹⁴C) colesterol fueron comprados a Amersham. La diosgenina-³H se preparó por el método de Wilzbach (30). Los productos colaterales en el marcaje de la diosgenina fueron los derivados 5-alfa y 5-beta reducidos (tigogenina y esmilagenina, respectivamente), cuya estructura se muestra en la FIGURA 1.

RESULTADOS PREVIOS

La purificación de los esteroides se realizó por cromatografía en columna o en placa fina con gel de sílice 660. La única dificultad cromatográfica fue la separación entre diosgenina y tigogenina, que finalmente pudo llevarse a cabo utilizando el sistema de solventes benceno / acetato de etilo (80/20, v/v) en tres corridas secuenciales. Los valores de Rf son de 0.68, 0.55 y 0.48 para esmilagenina, diosgenina y tigogenina, respectivamente. Estos valores son mejores que los reportados por otros investigadores (31).

Los esteroides purificados por este sistema de solventes (benceno/ acetato de etilo) mostraron un solo pico en cromatografía de gases cuando las condiciones del cromatógrafo fueron: detector (310 °C), inyector (310 °C), horno (280 °C), N₂ (250 Kpa), columna (WHP, SE-30 al 10 %, 1 metro), tipo de detector (ionización por flama). Bajo estas condiciones, los tiempos de retención observados fueron:

<u>COMPUESTO</u>	<u>TIEMPO DE RETENCION (min)</u>
colesterol	6.35
esmilagenina	8.21
diosgenina	8.78
tigogenina	9.09
B-sitosterol	9.70

Los puntos de fusión para los diferentes esteroides fueron:

COMPUESTO	REPORTADO (°C)	EXPERIMENTAL (°C)
β -sitosterol	140	135-137
esmilagenina	185	184-185
tigogenina	203	198-199
diosgenina	204-207	200-202

Los espectros de absorción en infrarrojo de diosgenina, esmilagenina, tigogenina y β -sitosterol se muestran en las FIGURAS 10-13 y en la TABLA 2, que concuerdan con lo previamente reportado (32-34). Se puede observar además, que el estándar de esmilagenina mostró otras bandas de absorción no características (3510, grupo amino; 1930 y 1910 aldehído y cetona) de esta sapogenina, sugiriendo su contaminación, la cual se confirmó posteriormente por cromatografía en capa fina y de gases.

El espectro de masas de la diosgenina fría y de la marcada se muestra en las FIGURAS 2 y 3, y el análisis de las especies iónicas producidas por el método de ionización química con metano se muestra en la FIGURA 14 y en la TABLA 3. Los picos característicos de la sapogenina son los de 139 y 115 M/E (34,35).

El método colorimétrico de Lieberman-Burchard para la determinación del colesterol (FIGURA 15) requiere para desarrollar color la presencia de un alcohol en posición 3 beta y un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, características que llena la diosgenina, por lo que parece posible cuantificarla colorimétricamente

por este método. En la FIGURA 16 se muestra el espectro de absorción de la diosgenina y del colesterol con el reactivo de Lieberman-Burchard. Se observa que el colesterol posee dos máximos de absorción, a 625 y 400 nm, mientras que la diosgenina no muestra máximos de absorción característicos en la región de 300 a 700 nm (FIGURAS 16 y 17).

El método enzimático para la determinación de colesterol es otra posibilidad para cuantificar a la diosgenina, ya que se basa en la oxidación del grupo alcohol, acoplada a la reducción de un cromóforo. Utilizando este método no fue posible desarrollar color con diosgenina ni con el β -sitosterol.

El método de dilución isotópica ofrece las ventajas de cuantificar cantidades muy pequeñas de cualquier sustancia marcada, así como el de seguir su metabolismo. Utilizando esta técnica se hicieron los experimentos que a continuación se describen.

HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECTS OF DIOSGENIN; IN-VIVO AND
IN-VITRO STUDIES IN RAT.

Juárez-Dropeza, M.A. and J.C. Díaz-Zagoya.

Department of Biochemistry, School of Medicine, UNAM.

P. O. Box 70-159, Mexico, D.F.

04510, MEXICO.

and

J. L. Rabinowitz

Veterans Administration Medical Center

University of Pennsylvania

Philadelphia, PA 19104, U. S. A.

Abbreviated Title- Diosgenin action mechanism.

Address to Proof and Correspondence:

Dr. J.L. Rabinowitz
Chief, Radioisotope Research
Professor Biochemistry, U de PA
VA Hospital
39th & Woodland Avenue
Philadelphia, PA 19104

ABSTRACT

There are confirmed reports that diosgenin when given orally or parenterally decreases cholesterol plasma levels in rat, chicken and rabbits that have a diet-induced hypercholesterolemia. No mechanisms have been suggested to account for this action. To investigate this effect, 3H-diosgenin and isomers were prepared and several *in-vivo* and *in-vitro* experiments designed. The per-oral administration of diosgenin yielded 12% of the given dose distributed throughout: liver, spleen, epididymal fat, brain and carcass of the rat. In everted gut sacs, 3H-diosgenin was better absorbed than cholesterol. In these *in-vitro* tests diosgenin was recovered esterified to a lesser extent than did the absorbed cholesterol; these experiments also showed less esterification of cholesterol in the presence of diosgenin than in its absence. Based on the above results it is suggested that the observed hypocholesterolemic effects of diosgenin are caused by: a) lessened cholesterol absorption in the small intestine by decreases of cholesterol esterification and b) by actions occurring at extra-intestinal places, such as competition with diosgenin to be metabolized to new products, while some of the cholesterol is prevented from participating in these reactions.

INTRODUCTION

Hypocholesterolemic effects for diosgenin in rat, chicken and rabbit have been reported (1, 2, 3); no mechanisms or hypothesis for this cholesterol lowering exists. Among the probable mechanisms for the observed hypocholesterolemic effects could be: a) decreases in the rate of cholesterol intestinal absorption and/or synthesis b) increases in the catabolism, turnover and/or fecal excretion of cholesterol. It has been postulated that diosgenin may act at intestinal level by blocking cholesterol absorption by forming a cholesterol complex; however, it has been confirmed that diosgenin doesn't form complexes with cholesterol (3). The same levels of hypocholesterolemic effects for diosgenin were also observed when administered by intraperitoneal route (1). The goal of our studies are to quantitate and determine how and how much of diosgenin that was administered per-orally was absorbed and where it was localized. Also, to determine *in-vitro* by use of everted gut sacs the local effects of diosgenin on the intestinal mucosal esterification of cholesterol and the esterification and metabolism of diosgenin and its congeners (tigogenin and esmilagenin).

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS.- PPO, Dimethyl-POPOP, taurocholic acid (from ox bile) and β -sitosterol were purchased from SIGMA (St. Louis, MO). 25-hydroxycholesterol (5-cholesten-3 β , 25-diol) was from STERALOIDS (Wilton, NH). Estradiol-3-benzoate (1, 3, 5 (10)-estratrien -3, 17 β -diol 3-benzoate) was a gift from SYNTEX (MEXICO). Diosgenin, tigogenin and esmilagenin were kindly provided by Miguel Escobar del Rio, BEISA (MEXICO). 25-hydroxycholesterol was purchased already chromatographically purified by the supplier; while, all the other sterols were repurified by the t.l.c.

ISOTOPICALLY LABELED COMPOUNDS.- (1 α , 2 α (n)-3H) cholesterol (44 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL). 3H-diosgenin was prepared by the method of Wilzbach, (4). This method also yields the dihydrodiosgenin derivatives (5 α = tigogenin, and 5 β = esmilagenin) (fig. 1). The distribution of tritium label in these sapogenin were 56, 16 and 28 per cent for diosgenin, tigogenin and esmilagenin, respectively. The specific activity for diosgenin was 21.98 Ci/mol. It was impossible to assign a particular location for the tritium on the molecules (figs. 2, 3). Under alkaline treatment (33% NaOH) at 70 C, for 1 h, most of the label was chemically stable (90, 75, and 60 per cent for diosgenin, esmilagenin and tigogenin, respectively).

ANIMALS.- Male Wistar rats weighing 150-250 g were kept on a stock diet (Purina pellets and water, *ad libitum*) and maintained in a light-dark cycle (9:00 to 21:00 as light) for 1 week prior to any experiment.

IN-VIVO EXPERIMENTS.- The animals were starved 12 h before the initiation of any treatments. Two types of experiments were performed: (a) Fifteen rats were fed by intragastric tube with a suspension of 5% bovine serum albumin (BSA) and diosgenin 67 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ in isotonic saline. The dose for each rat was 7 μmol . The animals were sacrificed 6, 12, and 24 h after treatment and subsequently heart, liver, adrenal glands with kidneys, spleen, and epididymal fat were dissected out. The labeled materials used in these experiments was a mixture of diosgenin, tigogenin and esmilagenin. (b) Three groups of four rats each were fed by intragastric tube with a suspension of one of the following compounds: diosgenin 125 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, esmilagenin 29 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ or tigogenin 42 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ in 1% BSA in isotonic saline solution. The amount received for each rat was 2 μmol . The animals were sacrificed 6 h after treatment and the liver, kidneys, adrenal glands and small intestine were separated. The dissected tissues were saponified with 33% NaOH solution and subsequently extracted with 20 volumes of diethyl ether. The extracts were evaporated under a N_2 stream and their radioactivity determined. In other groups the dissected tissues were immediately homogenized with a solution of 1 mM taurocholic acid and subsequently extracted with

20 volumes of diethyl ether. The extracts were evaporated under a nitrogen stream and applied on silica gel G 60 thin-layer-chromatography (tlc) plates, developed with benzene: ethyl acetate, 80:20, (v/v). The detection of the sâpogenins was made by iodine vapor, the localized spots scrapped into scintillation vials and evaluated for radioactivity.

IN VITRO EXPERIMENTS.- Male Wistar rats were sacrificed by cervical dislocation and the dissected jejunum, immediately transferred to a solution 10 mM glucose in 0.9 % NaCl at 37 C. The everted gut sacs were incubated individually in glass vials at 37°C with the indicated sterols. The incubation medium (5 ml for each sac) was 1 mM taurocholic acid, 10 mM glucose in 0.9% NaCl solution, and the labeled sterols were added to the incubation medium in 10 µl of ethanol. At the end of the incubation period, the sacs were washed with the same medium; serose fluid was collected and the intestinal wall dried for 24 h at 70 °C and subsequently homogenized in a solution of 1 mM taurocholic acid in 0.9% NaCl. The incubation media, the washing fluid and the homogenization media were extracted with 20 volumes of diethyl ether and chromatographed as mentioned before.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis.- Labeled 3H-diosgenin was prepared by the Wilzbach (4) method. During this labeling, the *cis* and *trans* dihydro-diosgenin isomers (esmilagenin and tigogenin) were formed. They were identified by tlc with the aid of authentic standards. Mass spectroscopy analyses revealed no major differences in patterns between the authentic diosgenins (figs. 2, 3) and the prepared labeled 3H-materials.

In-vivo experiments.- When mixtures of the three sapogenins were orally administered, (table 1); a significant and rapid absorption occurred mainly in the carcass and the liver. No radioactivity was found in feces. Brain levels did increase slowly with time, perhaps due to a slow exchange rate. It has been reported that in bovines a phospholipid-complex containing diosgenin may form and then accumulate in the brain and that this phospholipid-complex shows hypotensive activity (5).

When each individual sapogenin was administered alone, approximately the same results were obtained (Fig. 4) as with the mixture. After feeding the rats, when the intestinal wall was extracted and was analyzed by tlc. It was observed that diosgenin and tigogenin had been absorbed and interconverted; but, that esmilagenin was transformed either to diosgenin or tigogenin. When diosgenin or tigogenin were orally administered both were found esterified (~ 2 %) in the intestinal wall. The findings of

esterifications suggests a competition with cholesterol for esterification sites on the mucosa.

In-vitro experiments.- Everted gut sacs were used to study the effects of diosgenin on cholesterol absorption at pH 6 and 7. The results (fig. 5) showed that for the first 60 mins, at pH 6, a large linear cholesterol uptake occurred with values close to the known physiological ones. Esterification rates were determined by assay on the newly formed cholesterol ester in the incubation medium. The increase of cholesteryl ester levels both at pH 6 and pH 7 (fig. 6A), may be related to the action of pancreatic cholesterol esterase which shows greater activity at pH 6.2 (6). In the intestinal wall there were no differences found in cholesteryl ester content at either pH values (fig. 6B); the esterification is known to be dependent on acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase (ACAT) esterase activity. To determine if diosgenin modifies this *in-vitro* cholesterol esterification activity; the everted sacs were incubated at pH 6 with labeled cholesterol and 0.2 mg of one of each one of the following compounds: diosgenin (D), 25-hydroxycholesterol (25), β -sitosterol (B), and estradiol-3-benzoate (BzE). Controls were sacs (C) with only cholesterol. β -sitosterol was the only one of the compounds that produced a decrease of cholesterol uptake (2.7%) as compared to the uptake values of control sacs (4.6%). The amount of free cholesterol recovered from the intestinal wall was greater in the B-sitosterol incubated sacs than for other

compounds (figs. 7A, 7B). It is known that β -sitosterol inhibits ACAT activity and cholesterol absorption at the intestinal level (7) but the molecular mechanism for this activity is unknown. Both diosgenin and BzE inhibited cholesterol esterification at the intestinal wall, ACAT *in-vitro* activity is known to be reduced in the presence of estradiol (8), a fact that agrees with these results, and confirms prior work.

While, 25-hydroxycholesterol is a known activator of ACAT (8) under the experimental conditions used this was not observed.

Extracellular cholesterol esterification was higher in the presence of 25-hydroxycholesterol than in control sacs. If the main driving force responsible for the intestinal cholesterol absorption occurs by a chemical concentration gradient; increasing the concentration difference between the lumen and the intestine could occur by esterification of the cholesterol in the intestine. These results open the following questions: 1) is the quantity of mobilized and modified sterols sufficient to inhibit cholesterol absorption?, 2) is diosgenin and the other sterols able to modify pancreatic cholesterol esterase and ACAT activities?, 3) is the incubation time adequate for studies on the uptake of these sterols?, 4) are these sterols alternate substrates for ACAT and pancreatic cholesterol esterase ?. To answer the last two of these questions, ³H-diosgenin uptake was compared with labeled cholesterol uptake (fig. 8), by the amount of sterol esters found in the incubation medium and in the intestinal wall (figs. 9A, 9B). These results showed that

diosgenin uptake was greater than cholesterol uptake but diosgenin esterification by the esterase was low; on the other hand, the ACAT activity on diosgenin increased with time. It is suggested that diosgenin may become an alternate substrate for enzymes and thus be an inhibitor of esterification. The type of enzymatic inhibition could not be determined in these studies. Results indicate that diosgenin was well absorbed, about 12% of the administered dose, while B-sitosterol and other phytosterols are absorbed much less. The isolation of 3H derivatives of diosgenin from various tissues both in the polar and non-polar regions of the chromatograms obtained in lipid assays suggests that diosgenin can be metabolized both *in-vivo* and *in-vitro* and subsequently transported by the vascular systems of the rat. Since there are reports of isolation of B-sitosterol sulfate esters (9) and phospholipids derivatives of phytosterols in bovine brain (5), and acyl-ester derivatives in human tissues (10) of patients with sitosterolemia and xanthomatosis; these observations fit well with our recovery in the rat of sterols in the brain, liver and carcass with radioactivity derived from the 3H-diosgenin given to the rat.

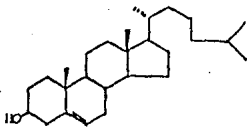
The data obtained from the *in-vitro* 3H-diosgenin everted gut sacs confirms the existence of specific sites in the intestinal mucosa that show competitive esterification between cholesterol and diosgenin.

TABLE 1. Percentual distribution* of the absorbed diosgenin labeled.

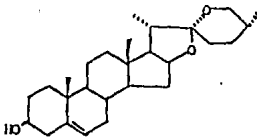
TISSUE	n	Time After oral Administration		
		6 HOURS	12 HOURS	24 HOURS
CARCASS	5	78.56 ± 2.6	82.00 ± 1.7	76.00 ± 6.5
LIVER	5	12.42 ± 2.9	8.80 ± 6.8	11.60 ± 6.3
ADRENAL GLANDS AND KIDNEYS	5	2.49 ± 0.7	1.85 ± 1.4	2.15 ± 0.7
EPIDIDYMAL FAT	5	1.68 ± 0.3	1.40 ± 1.1	2.91 ± 2.5
SPLEEN	5	1.52 ± 0.5	0.99 ± 0.6	1.90 ± 1.4
HEART	5	1.09 ± 0.3	0.87 ± 0.5	2.30 ± 3.3
BRAIN	5	0.95 ± 0.3	2.24 ± 1.1	3.20 ± 2.2
BLOOD	5	0.39 ± 0.1	2.24 ± 1.5	0.52 ± 0.2
TOTAL (without digestive tract and feces).		100 %	100 %	100 %

* The values are expressed as $\bar{X} \pm SD$.

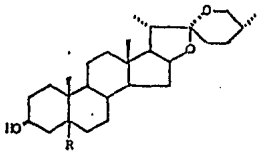
Table 1. -Male Wistar rats were fed orally with a suspension of a mixture of diosgenin, esmilagenin and tigogenin; as indicated in experimental section they were sacrificed and its tissular radioactivity counted at the mentioned times. Mean (n=5) for absorption percentage of the administered dosis, for each time, was: 6 h (13.5), 12 h (14.4), and 24 h (6.7). Recovered radioactivity in organic phase ranged from 21 to 39 %.



CHOLESTEROL



DIOSGENIN



DIHYDRODIOSGENIN

"CIS" - "TRANS"
CONFIGURATION



"TRANS"



"CIS"

R = 5 β = ESMILAGENIN

R = 5 α = TIGOGENIN

Figure 1. Cholesterol structural analogy with diosgenin, esmilagenin, and tigogenin.

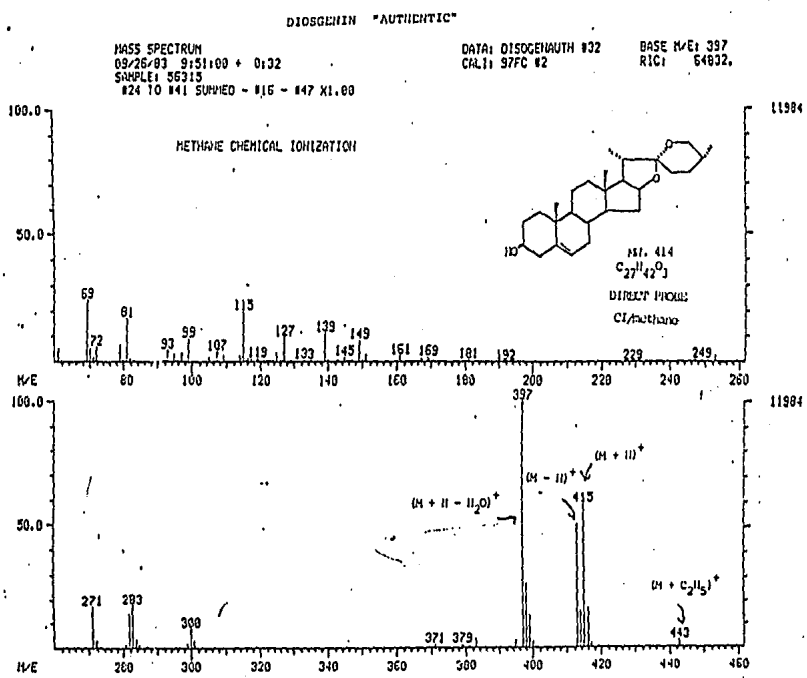


Figure 2. Mass spectrum of "authentic" diosgenin (non labeled, pure diosgenin). Base pick is located at 397 m/e and the father pick at 415 m/e. Other ionic molecular species are indicated.

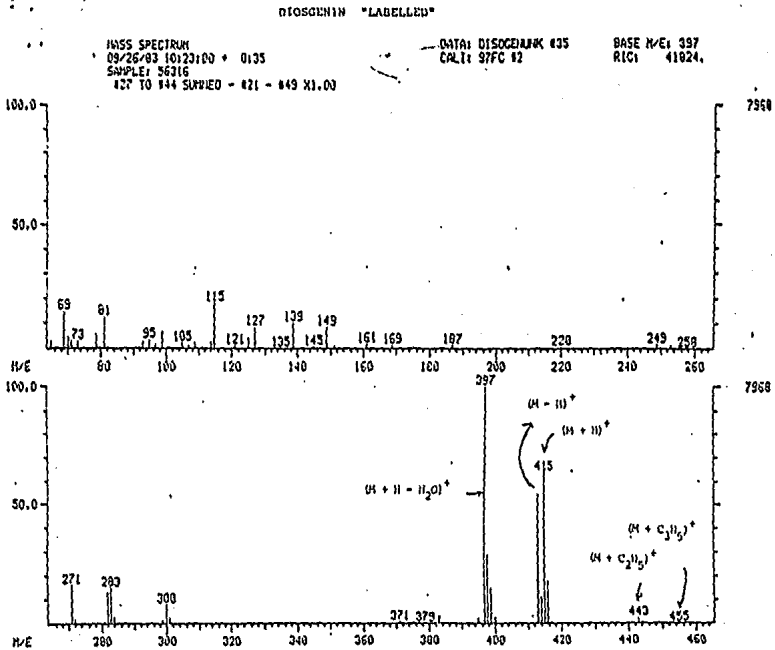


Figure 3. Mass spectrum of "labelled" diosgenin (a mixture of labelled diosgenin, tiogogenin and esmilagenin). Base and father picks are non different of "authentic" diosgenin.

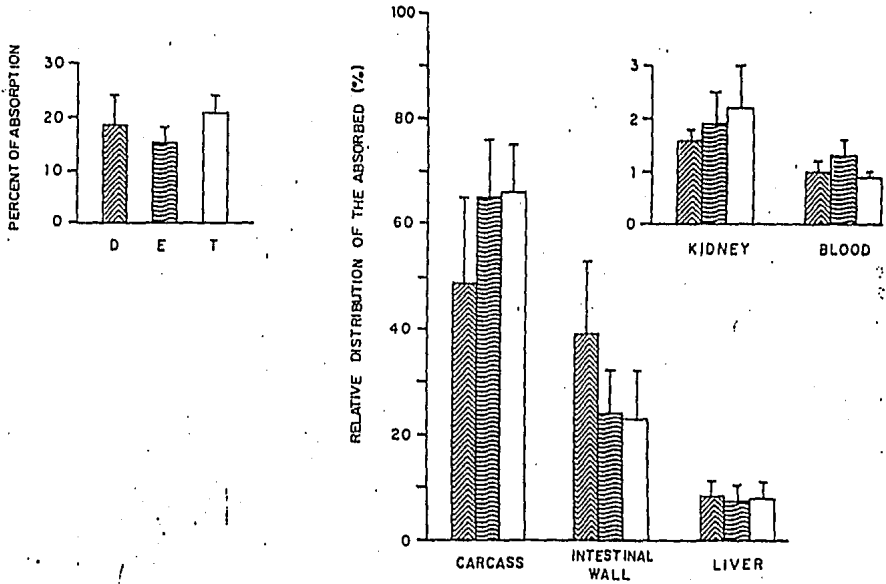


Figure 4. *In-vivo* absorption and tissular distribution of labeled diosgenin, esmilagenin and tigogenin. These sapogenins were administered orally as indicated in the text. Results are expressed as mean \pm SD of four rats.

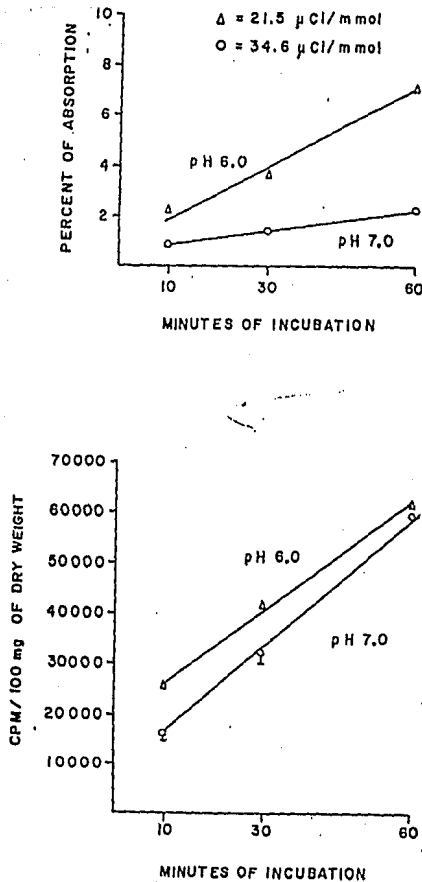


Figure 5. Effect of pH on the cholesterol uptake by everted gut sacs. Sacs were incubated individually in a solution 1 mM crude taurocholic acid (from ox bile), 13 nmol cholesterol (sp. act. 34.6 μ Ci/mmol or 21.5 μ Ci/mmol, for pH 7 and 6, respectively), 10 mM glucose, and 0.9% NaCl, for 10, 30 and 60 min at 37°C. Six sacs obtained from each rat were analyzed along the incubation period, for both pH values. Results are expressed as mean \pm SD from two determinations. Upper panel represents the percentage of uptake from added initial cholesterol, and lower panel express the sp. act. of dry intestinal weight.

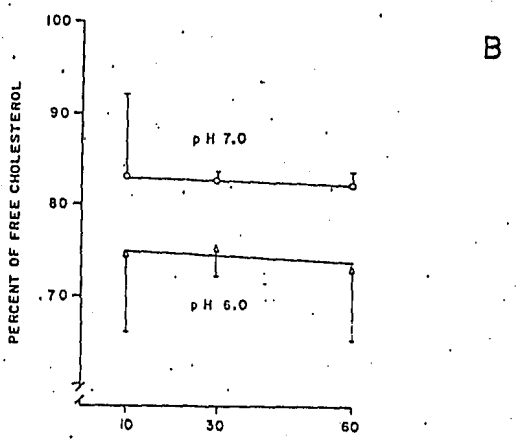
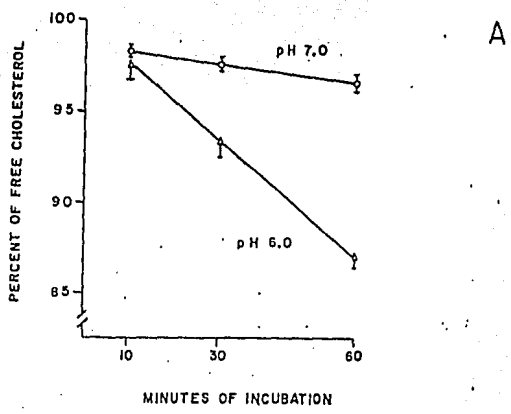


Figure 4. Effect of pH on cholesterol esterification by extracellular (A) or intracellular enzymes (B). Incubation conditions are as in Fig. 5. In both compartments (incubation medium and intestinal wall) total cholesterol was separated by tlc and fractions corresponding to unesterified and esterified forms of cholesterol counted. Results are expressed as mean \pm SD from remnant percentage of unesterified cholesterol in the incubation medium (A) or the intestinal wall (B).

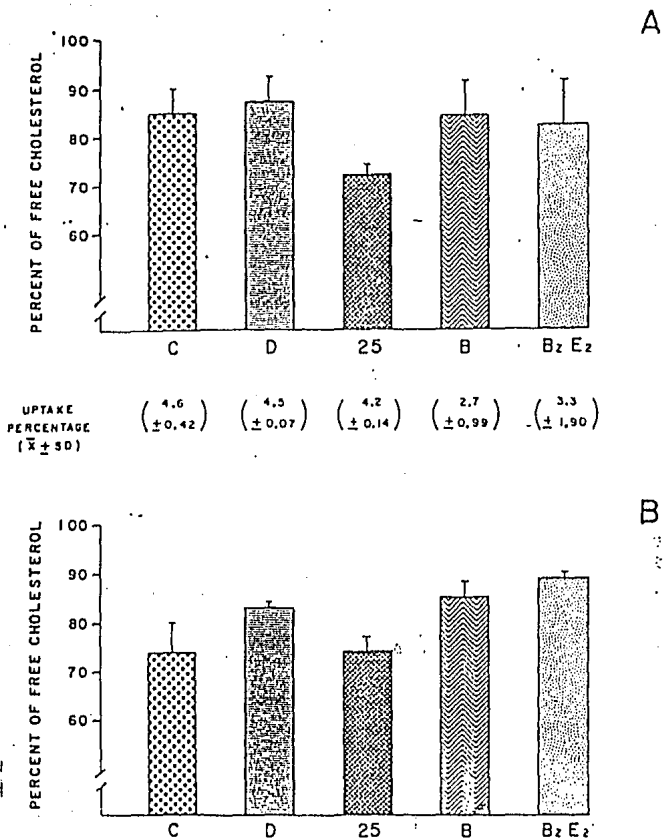


Figure 7. Effect of several sterols on cholesterol uptake and cholesterol esterification activities. Incubation conditions are as in fig. 5, at pH 6, 37°C, per 1 h. Additions to medium consist of 0.2 mg of any of the following unlabeled compounds: diosgenin (D), 25-hydroxycholesterol (25), β -sitosterol (B), estradiol-3 benzoate (BzE); control sacs contained only cholesterol (C). For each rat (six sacs) the sterols were incubated in duplicate and compared with control sacs. Upper panel (A) shows the remnant unesterified cholesterol in the incubation medium, and lower panel (B) the same data at the intestinal wall. Results are expressed as mean \pm SD.

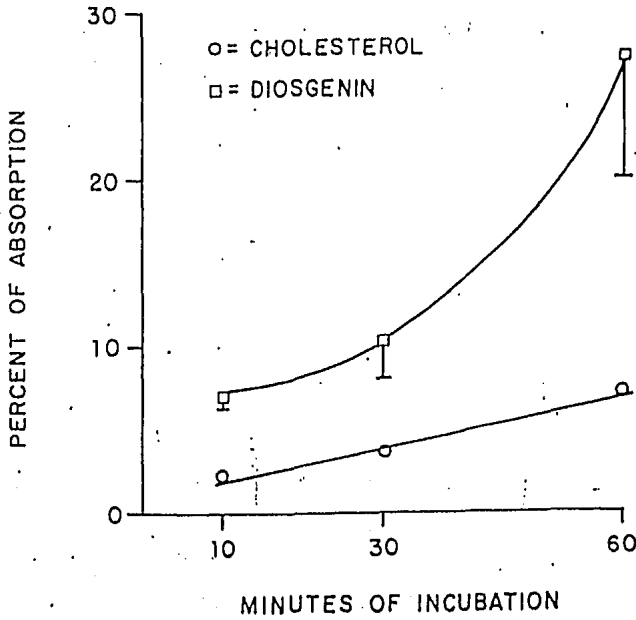


Figure 8. Cholesterol or diosgenin uptake by everted gut sacs. For each rat (six sacs) either labeled diosgenin or cholesterol were added to incubation medium. Incubation conditions were as in fig. 5. pH 6 at 37°C. Results are expressed as mean \pm SD.

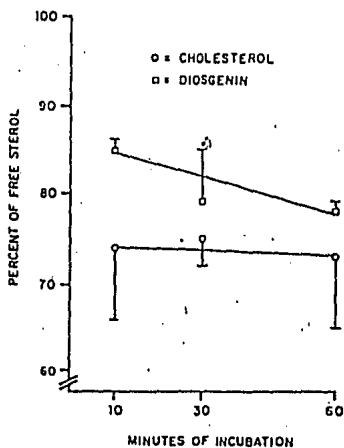
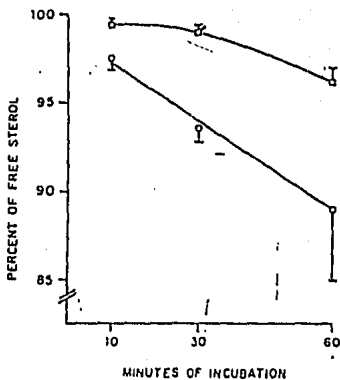


Figure 9. Esterification of cholesterol or diosgenin by everted gut sacs. Total sterols were extracted from the incubation medium or the intestinal wall and subsequently separated by tlc. Fractions obtained from free sterol and esterified sterol were counted and expressed as mean \pm SD of the remnant unesterified fraction. Activity related to pancreatic cholesterol esterase is shown in the upper panel (A), and the activity related to ACAT is shown in the lower panel (B).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Research Grant PCSABNA-020827 from National Council of Science and Technology, Mexico City.

REFERENCES

- 1.- Laguna, J., A. Gómez-Puyou, A. Peña, and J. Guzmán García. 1962. Effect of diosgenin on cholesterol metabolism. *J. Atheroscler Res.* 2:459-470.
- 2.- Díaz-Zagoya, J.C., J. Laguna, and J. Guzmán-García. 1971. Studies on the regulation of cholesterol metabolism by the use of its structural analogue, diosgenin. *Biochem Pharm.* 20: 3473-3480.
- 3.- Cayen, M. N., and D. Dvornick. 1979. Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats. *J. Lipid Res.* 20: 162-174.
- 4.- Wilzbach, K. E. 1957. Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 1013-1018.
- 5.- Tsukatani, H., K. Takauchi, J. Yoshida, S. Yamada, A. Tokumura, and C. Hamaguchi. 1985. Isolation of diosgenin ((25R)-spirost-5-en-3 β -ol) from lysate of a new hypotensive phospholipid occurring in bovine brain. *J. Neurochem.* 44: 658-661.
- 6.- Gallo, L.L., S. Myers, and G.V. Vahouny. 1984. Rat intestinal acyl Coenzyme A: cholesterol acyl transferase properties and localization. *Proc. Soc Exp Biol Med.* 177: 188-196.
- 7.- Suckling, K.E., and E.F. Stange. 1985. Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 26: 647-671.

- 8.- Field, J. F. 1984. Intestinal cholesterol esterase: intracellular enzyme or contamination of cytosol by pancreatic enzymes?. *J. Lipid Res.* 25: 389-399.
- 9.- Prasad, V.V.K., E. El Maraghy, L. Ponticorvo, and S. Lieberman. 1985. Detection in extracts of bovine brain of lipophilic complexes of sulfate esters of cholesterol and β -sitosterol. *Proc. Natl Acad Sci-USA.* 82: 2657-2659.
- 10.- Salen, G., I. Horak, M. Rothkopf, J.L. Cohen, J. Speck, G.S. Tint, V. Shore, B. Dayal, T. Chen, and S. Shefer. 1985. Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J. Lipid Res.* 26: 1126-1133.

EXPERIMENTOS RECIENTES

Los experimentos descritos en la sección precedente nos han mostrado que la diosgenina además de absorberse *in vivo* por el animal de experimentación, puede metabolizarse aunque en mínimas proporciones. La esterificación de la diosgenina nos sugirió que pudiera actuar como inhibidor de la esterificación del colesterol, por lo que probamos *in vitro* su capacidad para inhibir la absorción y esterificación del colesterol. En la TABLA 4 se muestra que independientemente de la actividad específica, la absorción del colesterol es similar en el mismo animal.

Los resultados de la FIGURA 8 podrían hacernos pensar que la diosgenina altera de alguna forma la permeabilidad de las células intestinales y que posiblemente a esto se deba que la diosgenina se absorba más que el colesterol. En la TABLA 5 se muestra que cuando la diosgenina y el colesterol se incuban simultáneamente con los sacos invertidos de intestino, la absorción de cada uno de estos esteroides es similar a la observada cuando se incuban individualmente, apoyando esto los resultados mostrados en la FIGURA 8.

El hecho de que la diosgenina se absorba en mayor proporción que el colesterol por los sacos invertidos de intestino de rata puede deberse a que su concentración intracelular es inicialmente nula o muy baja, mientras que la del colesterol es mayor, ya que la propia célula también lo sintetiza. Preincubando con diosgenina a los sacos (TABLA 6) no se logró inhibir la absorción del colesterol, posiblemente por el poco tiempo de incubación.

TABLA 2. BANDAS DE ABSORCION CARACTERISTICAS EN I.R. DE LOS
ESTEROLES UTILIZADOS.

COMPUESTO	GRUPOS FUNCIONALES (cm ⁻¹)	'HUELLA DIGITAL' (cm ⁻¹)	
DIOSGENINA	-OH	3410, 1040	1150, 1040,
	=CH	3033	1015, 1000,
	-CH ₃ (a)	2952	980, 960,
	-CH ₂ - (a)	2929	910, 890,
	-CH ₃ (s)	2873	860, 830,
	-CH ₂ - (s)	2861	790
TIGOGENINA	-OH	3500, 3370, 3270,	1170, 1150,
		1045	1090, 1070,
	-CH ₃ (a)	2952	1045, 1030,
	-CH ₂ - (a)	2930	1015, 1000,
	-CH ₃ (s)	2873	970, 950, 910,
	-CH ₂ - (s)	2861	890, 860
ESMILAGENINA	-OH	3430, 1030	1160, 1150,
	-CH ₃ (a)	2952	1140, 1090,
	-CH ₂ - (a)	2928	1030, 1000,
	-CH ₃ (s)	2870	980, 960, 950,
	-CH ₂ - (s)	2862	910, 890, 860,
			820
B-SITOSTEROL	-OH	3420, 1050	1190, 1160,
	=CH	3030	1130, 1050,
	-CH ₃ (a)	2950	1020, 1005,
	-CH ₂ - (a)	2920	955, 880, 795,
	-CH ₃ (s)	2860	
	-CH ₂ - (s)	2840	

(s) = simétrico

(a) = asimétrico

TABLA 3. ESPECIES IONICAS IDENTIFICADAS EN EL ESPECTRO DE MASAS
DE LA DIOSGENINA

M / E	COMPOSICION ELEMENTAL	MASA CALCULADA	I.R. (%) [*]
443	C29 H47 O3	443	3.02
415	C27 H43 O3	415	58.74
400	C26 H40 O3	400	2.26
399	C26 H39 O3	399	13.60
397	C27 H41 O2	397	100.00
300	C21 H32 O	300	8.12
283	C21 H39	283	17.29
139	C9 H15 O	139	11.43
115	C6 H11 O2	115	19.79

*

I.R = intensidad relativa.

TABLA 4. ABSORCION DE COLESTEROL POR SACOS INVERTIDOS DE
INTESTINO DE RATA EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

ACT. ESPECIFICA	% DE ABSORCION *	cpm/ 100 mg peso seco *
21.5 μ Ci / mmol	8.3 , 10.2	70560 , 75860
43.0 μ Ci / mmol	11.0 , 8.6	157115 , 163928
64.5 μ Ci / mmol	8.7 , 6.2	250143 , 230122

* Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se expresan como valores individuales. Las condiciones de incubación fueron las indicadas en la figura 5 (pH 6 , 1 h).

TABLA 5. ABSORCION SIMULTANEA DE COLESTEROL Y DIOSGENINA EN
LOS SACOS INVERTIDOS DE INTESTINO DE RATA

ESTEROL	n	% DE ABSORCION	ISOTOPO	T. INCUBACION
colesterol (C)	2	4.2 \pm 0.42	¹⁴ C	30 min.
diosgenina (D)	2	12.1 \pm 2.26	³ H	30 min.
colesterol y diosgenina (C + D)	2 (C) (D)	5.1 \pm 0.35 11.2 \pm 2.80	¹⁴ C ³ H	30 min.

Todos los sacos fueron preparados del mismo animal.

TABLA 6. EFECTO DE LA PREINCUBACION CON DIOSGENINA SOBRE LA
 ABSORCION DE COLESTEROL POR SACOS INVERTIDOS DE INTESTINO DE RATA

CONDICIONES	TIEMPO DE (min)		% ABSORC.	*M. INCUB.		*PARED-INTEST.	
	PREINCUB.	INCUB.		C.L.	C.E.	C.L.	C.E.
s/diosg.							
	30	60	9.1	90	10	57	43
	30	60	8.6	90	10	64	36
c/diosg.							
	30	30	9.2	99	1	67	33
	30	30	9.2	98	2	62	38
	30	60	11.6	98	2	68	32
	30	60	9.6	97	3	66	34

Los sacos fueron preincubados con o sin diosgenina (600 µg / 60 ml medio de incubación) e incubados con o sin diosgenina (50 µg / 5 ml). Todos los sacos fueron obtenidos del mismo animal.

* Los resultados se expresan como porciento de colesterol libre (CL) y de colesterol esterificado (CE) en el medio de incubación y en la pared intestinal.

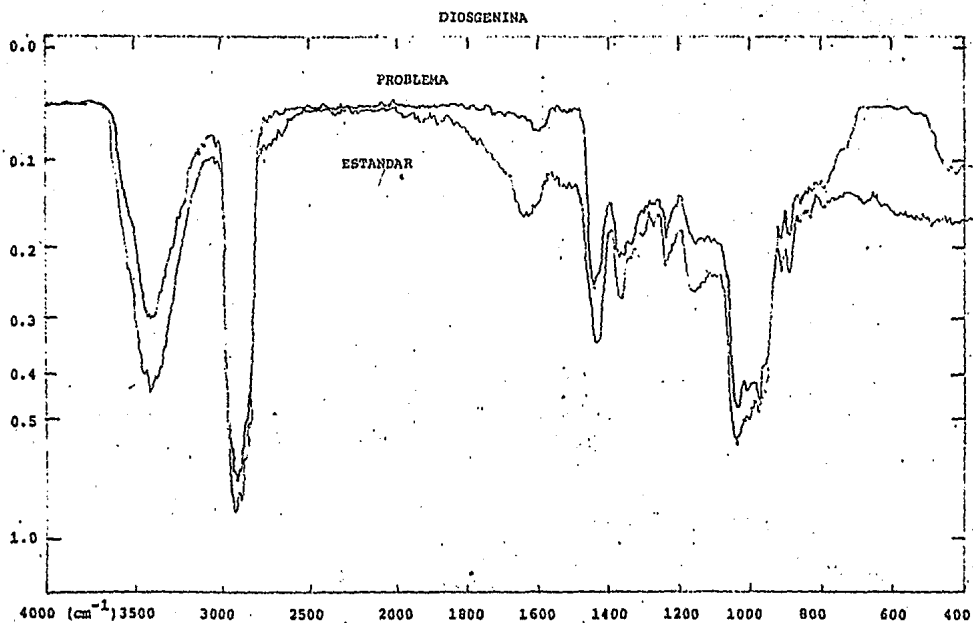


FIGURA 10. ESPECTRO EN INFRAROJO DE LA DIOSGENINA.

Se muestran simultaneamente los espectros del estandar y de la sapogenina purificada en columna con gel de silice G60. Las muestras se analizaron como pastillas con KBr contra aire como referencia.

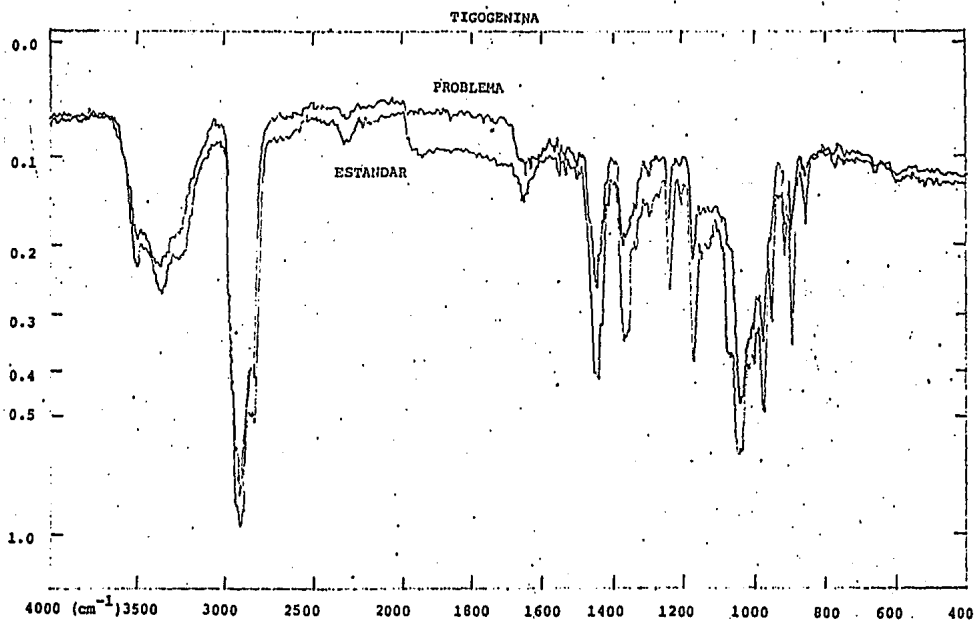


FIGURA 11 ESPECTRO EN INFRAROJO DE LA TIGOGENINA.

Las muestras se procesaron como en la figura 10.

ESMILAGENINA

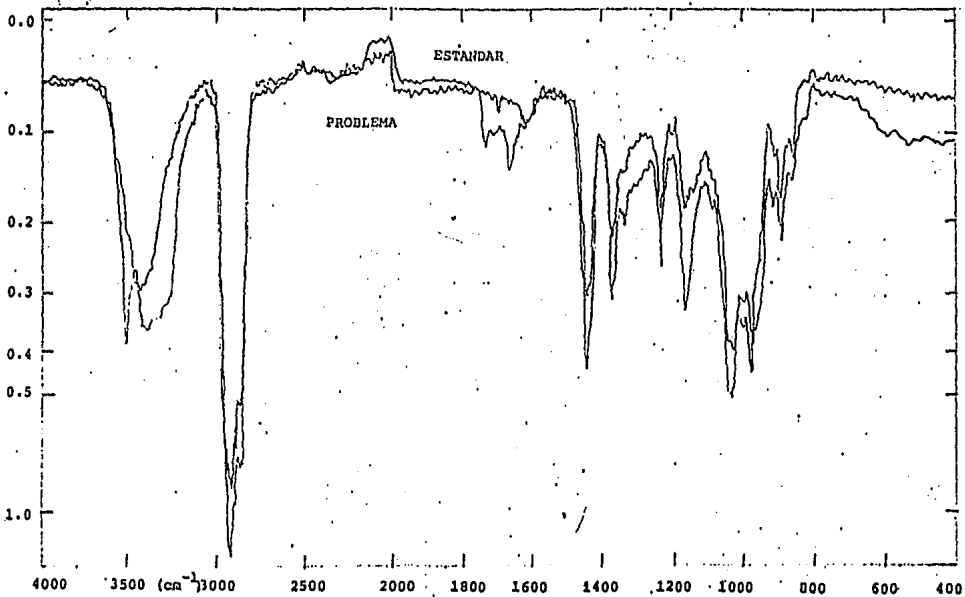


FIGURA 12 ESPECTRO EN INFRAROJO DE LA ESMILAGENINA.

Las muestras se procesaron como en la figura 10. Notar las bandas de absorción no características de las sapogeninas en el espectro del estandar.

β -sitosterol

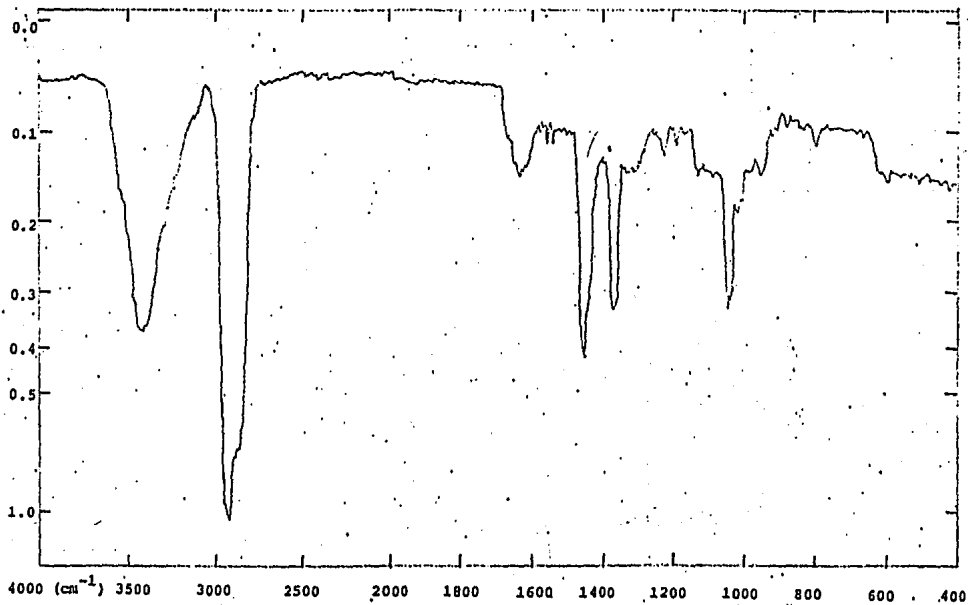


FIGURA 13 ESPECTRO EN INFRAROJO DEL β -SITOSTEROL.

La muestra se procesó como en la figura 10.

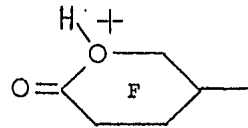
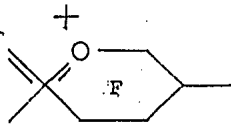
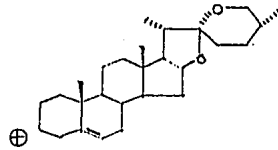
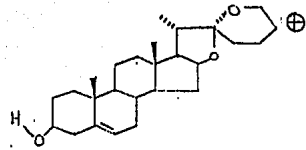
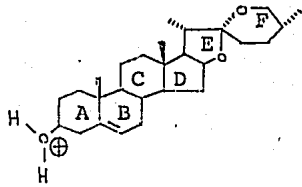


FIGURA 14 FRAGMENTACION IONICA DE LA DIOSGENINA.

FORMACION DE CROMOFOROS CON EL REACTIVO DE LIEBERMAN-BURCHARD

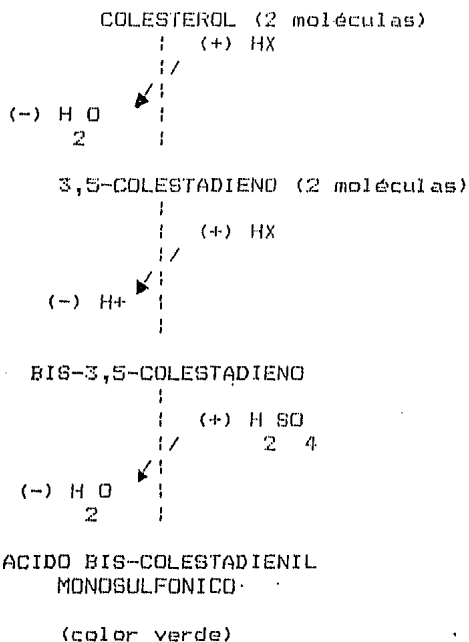


FIGURA 15. DESARROLLO DE COLOR CON EL REACTIVO DE LIEBERMAN-BURCHARD (inespecifico).

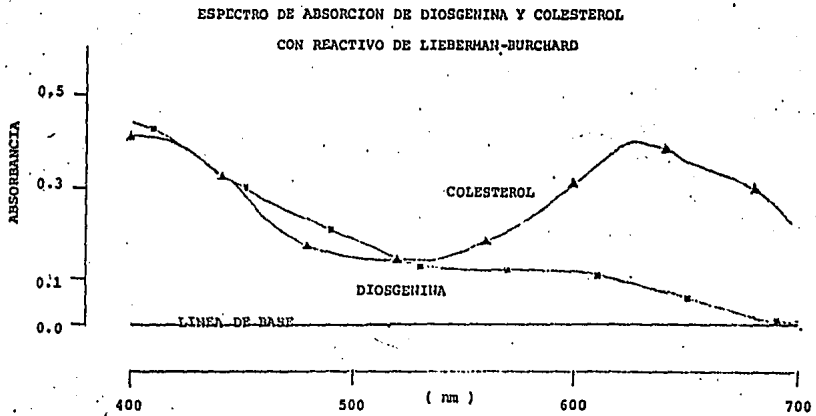


FIGURA 16. ESPECTRO DE ABSORCION DE DIOSGENINA Y COLESTEROL
CON EL REACTIVO DE LIEBERMAN-BURCHARD.

Los espectros se corrieron con 3 nm de 'slit'. Los máximos de absorción para el colesterol son 625 y 400 nm.

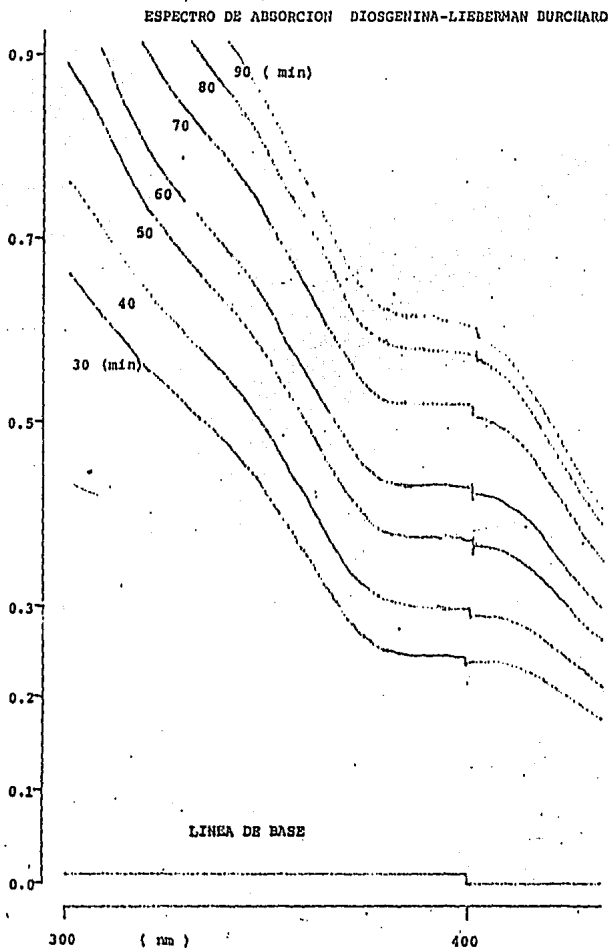


FIGURA 17. ESPECTRO DE ABSORCION EN U.V. DE LA DIOSGENINA CON EL REACTIVO DE LIEBERMAN-BURCHARD.

Los espectros se corrieron con 3 nm de 'slit'. La absorbancia no fue estable aún hasta las dos horas.

CONCLUSIONES

Los presentes experimentos demuestran que la diosgenina se absorbe *in vivo* por el animal de experimentación, y que dicha absorción es superior ($> 12\%$) a la reportada para otros esteroides vegetales (e.g., β -sitosterol $< 5\%$ de la dosis). La diosgenina, al igual que sus derivados 5 reducidos se encontraron en todos los tejidos analizados aunque predominaron en hígado, intestino delgado, cerebro y tejido adiposo. El hecho de que la diosgenina se encontrara en forma esterificada en la pared intestinal (aunque en mínima proporción) indicó la posibilidad de que la sapogenina compita con el colesterol por las enzimas que lo esterifican (colesterol esterasa y acil-CoA: colesterol O-aciltransferasa), y sugiere un sitio molecular para su efecto hipocolesterolemizante.

No se descarta que la diosgenina pueda actuar dentro del propio organismo, ya que se observó su transformación en compuestos más polares, un hecho que concuerda con lo observado para otros fitosteroides (36-39).

Los resultados de los experimentos *in vitro* confirman la existencia de sitios específicos en la mucosa intestinal que esterifican competitivamente al colesterol y a la diosgenina. La actividad esterificante del colesterol es susceptible de ser modulada por otros esteroides tanto en la forma positiva como negativa.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

PERSPECTIVAS

Debido a que la diosgenina es capaz de inhibir la actividad esterificante del colesterol por los sacos invertidos de intestino de rata, se apoya la hipótesis de que el gradiente de colesterol libre es el responsable de la absorción del colesterol, y sugiere un mecanismo molecular por el cual la diosgenina tenga propiedades hipocolesterolemiantes.

Se ha reportado que las actividades esterificantes del colesterol a nivel intestinal pueden ser moduladas por otros esteroles, ejemplo de ello es el 25-hidroxicolesterol, que estimula la actividad de la ACAT, y el β -sitosterol que la inhibe. En un ensayo *in vitro* con preparaciones enzimáticas puras (colesterol esterasa y ACAT), sería posible evaluar los requerimientos estructurales de las enzimas que esterifican al colesterol y la capacidad de modular a dichas enzimas. Una vez teniendo moduladores específicos (inhibidores y estimuladores) para cada una de las enzimas, podría evaluarse el papel de dichas enzimas en la absorción del colesterol, además de ofrecer herramientas terapéuticas alternas para los casos de hipercolesterolemia.

El hecho de que la diosgenina pueda ser esterificada por la pared intestinal, y de que existan reportes que demuestren que algunos fitosteroles se puedan metabolizar, sugiere la posibilidad de que la diosgenina pueda tener efectos extraintestinales ya sea como tal o como un derivado, por lo cual es interesante conocer cuál es el destino metabólico de la diosgenina en el ani-

mal de experimentación. Recientemente se ha reportado (40) que algunos fitosteroles (entre ellos la diosgenina) aumentan el eflujo biliar del colesterol, desde un 50 % hasta el 300 % , sin modificar el flujo de fosfolípidos y de ácidos biliares. Este efecto pudiera deberse a que la diosgenina o un metabolito de ella inhiba la esterificación del colesterol a nivel hepático, disminuyendo así su acumulación como acil-éster e incrementando su excreción biliar en forma de colesterol libre.

No se conoce como es transportada la diosgenina a través de la sangre, ni si es capaz de modificar el metabolismo de las lipoproteínas. Con la disponibilidad de la sapogenina marcada isotópicamente se podría conocer como se transporta en el torrente sanguíneo y si es un sustrato alternativo para la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT).

En fin, es deseable conocer si la diosgenina al igual que otros esteroides vegetales pueden modular la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del colesterol como la ACAT, colesterol esterasa, LCAT, 7-alfa-hidroxiilasa y HMG-CoA reductasa. La información obtenida de estos estudios nos permitirá un mejor entendimiento del metabolismo de esta molécula tan importante y posiblemente, las bases experimentales para regular la actividad de dichas enzimas.

REFERENCIAS

- 1.- Mathé, D. et Lutton, C.; Le cholestérol système. Aspects dynamiques et métaboliques. *J. Physiol-Paris*. 79: 41-97, 1984.
- 2.- Norum, K. R., Berg, T., Helgerund, P., and Drevon, C. A.; Transport of cholesterol. *Physiol. Rev.* 63(4): 1343-1419, 1983.
- 3.- Srere, P.A., Chaikoff, I.L., Treitman S.S., and Burstein, L. S.; The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J. Biol.Chem.* 182: 629-634, 1950.
- 4.- Kandutsch, A.A., and Saucier, S.E.; Regulation of sterol synthesis in developing brains of normal and jimpy mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 135: 201-208, 1969.
- 5.- Siperstein, M.D.; Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J. Lipid Res.* 25: 1462-1468, 1984.
- 6.- Chen, H. W., Kadutsch, A.A., and Waymouth, C.; Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* 251: 419-421, 1974.
- 7.- Brown, M.S., and Goldstein, J.L.; Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 249: 7306-7314, 1974.
- 8.- Kandutsch, A. A., and Chen, W. H.; Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 252:

409-415, 1977.

- 9.- Kaneko, I., Hazama-Sjimada, Y., and Endo, A.; Inhibitory effects of lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Eur. J. Biochem.* 87: 313-321, 1978.
- 10.- Brown, M. S, and Goldstein, J. L.; The LDL receptor and HMG-CoA reductase--Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. In: *CURRENT TOPICS IN CELLULAR REGULATION*, VOL. 26. pp.3-15. Academic Press, Inc. (Orlando), 1985.
- 11.- Díaz Zagoya, J. C. y Juárez Dropeza, M. A.; Algunos aspectos de la regulacion de la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa y su papel en la colesterogénesis hepática. *Boletín de Educación Bioquímica* 1(3): 3-9, 1982.
- 12.- Juárez Dropeza, M. A. y Díaz Zagoya, J.C.; Enzimas clave en el metabolismo del colesterol y su regulación. *Boletín de Educación Bioquímica.* 4(1): 8-20, 1985.
- 13.- Borgstrom, B., Lindhe, B. A., and Wlodawer, P.; Absorption and distribution of cholesterol-4-¹⁴C in the rat. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 99: 365-368, 1958.
- 14.- Smith, A.L., Hauk, R., and Treadwell, C.R.; Uptake of cholesterol and cholesterol esters by inverted sacs of rat intestine. *Amer. J. Physiol.* 193: 34-40, 1958.
- 15.- Shiratori, T., and Goodman, D.S.; Complete hydrolysis of dietary cholesterol esters during intestinal absorption.

Biochim. Biophys. Acta. 106: 625-627, 1965.

- 16.- Carey, M. C., Small, D. M., and Bliss, C.M.; Lipid digestion and absorption. Annu. Rev. Physiol. 45: 651-677, 1983.
- 17.- Thomson, A.B.R., and O'Brien, B. D.; Uptake of cholesterol into rabbit jejunum using three *in vitro* techniques: importance of bile and micelles and unstirred layer resistance. Amer. J. Physiol. 241: G270-G274, 1981.
- 18.- Vahouny, G.V., Woo, C.H., and Treadwell, C.R.; Quantitative effects of bile salt and fatty acid on cholesterol absorption in rat. Amer. J. Physiol. 193: 41-46, 1958.
- 19.- Hardison, W.G.M., and Grundy, S.M.; Effect of ursodeoxycholate and its taurine conjugate on bile acid synthesis and cholesterol absorption. Gastroenterology 87: 130-135, 1984.
- 20.- Gallo, L.L.; Sterol ester hydrolase from rat pancreas. Methods in Enzymology 71: 664-674, 1981.
- 21.- Clark, S. B. , and Tercyak, A. M. ; Reduced cholesterol transmucosal transport in rats with inhibited mucosal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and normal pancreatic function. J. Lipid Res. 25: 148-159, 1984.
- 22.- Blumer, A., Watt, S.M., and Simmonds, W. J.; Homeostasis of mucosal cholesterol in the small intestine of the rat. Lipids. 19(10): 721-727, 1984.
- 23.- Suckling, K. E., and Stange, E. F.; Role of acyl-CoA : cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. J. Lipid Res. 26: 647-671, 1985.
- 24.- Gallo, L. L., Clark, S. B., Myers, S., and Vahouny, G. V.;

Cholesterol absorption in rat intestine: role of cholesterol esterase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase.

J. Lipid Res. 25: 604-612, 1984.

25.- Field, F. J.; Intestinal cholesterol esterase: intracellular enzyme or contamination of cytosol by pancreatic enzymes ?.

J. Lipid Res. 25: 389-399, 1984.

26.- Laguna, J., Gómez-Puyou, A., Peña, A., and Guzmán-García, J.; Effect of diosgenin on cholesterol metabolism.

J. Atheroscler. Res. 2: 459-470, 1962.

27.- Díaz-Zagoya, J. C., Laguna, J., and Guzmán-García, J.; Studies on the regulation of cholesterol metabolism by the use of its structural analogue, diosgenin.

Biochem. Pharm. 20: 3473-3480, 1971.

28.- Cayen, M. N., and Dvornik, D.; Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats. J. Lipid Res. 20: 162-174, 1979.

29.- Vahouny, G. V., Conor, W.E., Subramanian, S., Lin, D.S., and Gallo, L.L.; Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, and fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption.

Amer. J. Clin. Nutr. 37: 805-809, 1983.

30.- Wilzbach, K.E.; Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. J. Am. Chem. Soc. 79: 1013-1018, 1957.

31.- Lisboa, B.P.; Thin-layer chromatography of steroids, sterols, and related compounds. Methods in Enzymology XV: 3-157, 1969.

32.- Smith, A. M., and Eddy, C. R.; High resolution infrared spectra of steroids in the carbon-hydrogen stretching region.

Anal. Chem. 31: 1539-1542, 1959.

33.- Morrison, R.T., and Boyd, R.N.; Organic chemistry. 3rd Edition. Allyn and Bacon, Inc. (Boston), 1973. pp.405-451.

34.- Watty, M.; Quimica analitica. Alhambra Universidad (México), 1982. pp.479-570.

35.- Tsukatani, H., Takauchi, K., Yoshida, J., Yamada, S., Tokumura, A., and Hamaguchi, C.; Isolation of a new hypotensive phospholipid occurring in bovine brain. J. Neurochem. 44: 658-661.

36.- Bhattacharyya, A.K., and Connor, W.E.; β -sitosterolemia and Xanthomatosis. J. Clin. Invest. 53: 1033-1043, 1974.

37.- Salen, G., Ahrens, E. H., and Grundy, S. M.; Metabolism of β -sitosterol in man. J. Clin. Invest. 49: 952-967, 1970.

38.- Prasad, V. V. K., El Maraghy, E., Ponticorvo, L., and Lieberman, S.; Detection in extracts of bovine brain of lipophilic complexes of sulfate esters of cholesterol and β -sitosterol. Proc. Natl. Acad. Sci-USA. 82: 2657-2659, 1985.

39.- Salen, G., Horak, I., Rothkopf, M., Cohen, J.L., Speck, J., Tint, G. S., Shore, V., Dayal, B., Chen, T., and Shefer, S.; Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. J. Lipid Res. 26: 1126-1133, 1985.

40.- Ulloa, N., and Nervi, F.; Mechanism and kinetic characteristics of the uncoupling by plant steroids of biliary cholesterol from bile salt output. Biochim. Biophys. Acta. 837: 181-189, 1985.