

**EFFECTO *IN VIVO* DE LOS DERIVADOS FIBRICOS SOBRE  
ENZIMAS MICROSOMALES IMPLICADOS EN LA SINTESIS  
HEPATICA DE ACIDOS GRASOS**

MARTA ALEGRET JORDA

1993

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y QUIMICA TERAPEUTICA**

**Programa de Doctorado: Farmacología. Bienio 1990-1992.**

**EFECTO *IN VIVO* DE LOS DERIVADOS FIBRICOS  
SOBRE ENZIMAS MICROSOMALES IMPLICADOS EN  
LA SINTESIS HEPATICA DE ACIDOS GRASOS**

Tesis que presenta Dña. Marta Alegret Jordà para optar al título de Doctora en Farmacia, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Laguna Egea y siendo tutor el Dr. Tomàs Adzet Porredón.



Barcelona, Octubre 1993.





De esta Tesis se han derivado las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

- "Effect of fibric acid derivatives on rat hepatic enzymes involved in fatty acid metabolism in vivo". M. Alegret, R. Ferrando, R. M. Sánchez, M. Merlos, J.C. Laguna. XI International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism. Florencia, Mayo 1992.

- "Comparison of the effect of treatment of rats and guinea-pigs with gemfibrozil on enzyme activities related to fatty acid metabolism". M. Alegret, E. Cerqueda, M. Vázquez, M. Merlos, J.C. Laguna. 1st International Congress of the International Society for the study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL). Lugano, Junio 1993.

- "Correlation between peroxisomal  $\beta$ -oxidation and enzymes related to fatty acid metabolism in rats treated with fibric acid derivatives". M. Alegret, R. Ferrando, M. Merlos, J.C. Laguna. 1st International Congress of the ISSFAL. Lugano, Junio 1993.

- "Effect of fibrate feeding on rat liver microsomal palmitoyl-CoA synthetase and palmitoyl-CoA hydrolase activities". Br. J. Pharmacol., en evaluación.

- " Modification rat hepatic microsomal elongation and desaturation systems by fibrate feeding." J. Lipid Res., en preparación.

## AGRAIMENTS

En el moment d'acabar aquest treball, que representa per a mí no només una feina qualsevol, sinó un seguit d'anys de convivència diària amb els companys i professors del departament, de moments bons i no tan bons, d'aprenentatge i d'il·lusió, voldria expressar el meu agraïment

al Dr. Tomàs Adzet, Director de la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, per possibilitar la realització d'aquesta Tesi i pels seus bons consells

al Dr. Joan Carles Laguna, el seu entusiasme per la feina, les ganexes que m'ha encomanat de seguir endavant en la investigació i, sobre tot per la seva amistat i dedicació, que per a mi ha estat el més important

als Drs. Jordi Camarasa i Josep Iglesias, per l'interès que en tot moment han mostrat envers el meu treball

als components de la línia de investigació sobre hipolipemians: Rosa Sánchez, bona amiga i primera persona que em va ensenyar la feina de laboratori; Manel Merlos, tant pels sus coneixements i consells com per la seva simpatia i amistat; Manel Vázquez, un altre bon amic i gran entusiasta de la feina; Marisa Viñals, de qui sempre recordaré les llargues converses mantingudes; Sònia Muñoz, companya excel·lent, sempre a punt per animar en moments difícils

molt especialment, vull agrair el treball, molts cops fatigós, dels meus tesinadors Rosa Ferrando i Enric Cerqueda; també els agraeixo la paciència que han tingut amb mi; m'han ensenyat molt, i sense el seu ajut no hagués pogut fer aquesta Tesi

a tots els companys del laboratori, Rosa M., Mercè, M<sup>a</sup> José, Carme, Francesc per tantes hores compartides al laboratori, pel seu ajut i pels tips de riure que ens hem fet junts; també vull destacar l'optimisme constant i encomanadís de Teresa Iglesias, així com el seu ajut en la feina

a les meves amigues de la Facultat, sobre tot l'Anna, la Montse i la Roser, amb qui he compartit cinc anys de classes i molts més d'amistat

a la Rosa, per ser una gran amiga, per estar sempre al meu costat, i per saber escoltar i comprendre com només ella sap fer

a la meva família: a la meva mare, doncs sé que m'estima i que intenta comprendre'm sempre; molt especialment vull recordar la meva padrina, a qui tant li hagués agradat veure aquesta Tesi acabada

a en Joan, per l'amor que em demostra dia a dia i pel recolzament incondicional que em dóna; coneixe'l ha estat la millor cosa que m'ha passat en aquest laboratori; també li agraeixo l'ajut en l'elaboració final d'aquest llibre.

Finalment, agraeixo al Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya la concessió d'una beca que ha possibilitat que aquest treball es dugui a terme, tanmateix, els ajuts econòmics del FIS (91/0147) i DGICYT (SM91-0020).

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>PARTE TEORICA</b> .....	<b>10</b>
<b>I. BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS</b> .....	<b>10</b>
1. SINTESIS <i>DE NOVO</i> .....	10
2. ACIL-CoA HIDROLASAS Y ACIL-CoA SINTETASAS .....	14
3. ELONGACION DE ACIDOS GRASOS .....	17
4. DESATURACION DE ACIDOS GRASOS .....	23
4.1. Desaturasas .....	23
4.2. Regulación de los sistemas de desaturación .....	30
5. CADENAS DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL .....	33
<b>II. CATABOLISMO DE ACIDOS GRASOS</b> .....	<b>37</b>
<b>III. PROLIFERACION PEROXISOMICA</b> .....	<b>44</b>
1. PEROXISOMAS .....	44
2. DESORDENES PEROXISOMICOS .....	45
3. PROLIFERACION .....	47
1. Estructura de los proliferadores .....	48
2. Hepatomegalia .....	49
3. Inducción del citocromo P450IV .....	50
4. Teorías sobre el mecanismo de la inducción peroxisómica .....	51
5. Inducción peroxisómica y carcinogénesis .....	54
<b>IV. HIPERLIPOPROTEINEMIAS</b> .....	<b>58</b>
1. LIPOPROTEINAS .....	58
2. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS .....	59
3. HIPERLIPOPROTEINEMIAS .....	61

V. DERIVADOS DEL ACIDO FIBRICO .....	66
1. GENERALIDADES .....	66
2. CARACTERISTICAS FARMACOCINETICAS .....	68
3. EFECTOS ADVERSOS. CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES .....	69
4. USO CLINICO .....	71
5. EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE LOS FIBRATOS .....	71
6. MECANISMOS BIOQUIMICOS DE ACCION .....	73
 <b>METODOLOGIA .....</b>	 79
 1. CONDICIONES GENERALES .....	 79
1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION .....	79
1.2. OBTENCION DE LAS FRACCIONES CELULARES HEPATICAS .....	80
1.3. ESTUDIOS DE DISTRIBUCION SUBCELULAR .....	82
1.4. OBTENCIÓN DE PLASMA .....	83
1.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS .....	84
 2. PARAMETROS ENZIMATICOS .....	 85
2.1. METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS .....	85
2.2. METODOS RADIATIVOS .....	98
 3. PARAMETROS PLASMATICOS .....	 113
3.1. Colesterol plasmático .....	113
3.2. Triglicéridos .....	115
 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	 117
5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS .....	119



<b>RESULTADOS</b> .....	<b>120</b>
1. PARAMETROS NO ENZIMATICOS .....	120
2. PARAMETROS ENZIMATICOS <i>IN VITRO</i> .....	133
3. PARAMETROS ENZIMATICOS <i>IN VIVO</i> .....	135
3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES .....	135
3.2. $\beta$ -OXIDACION PEROXISOMICA .....	145
3.3. PALMITOIL-CoA HIDROLASAS .....	148
3.4. PALMITOIL-CoA SINTETASA .....	156
3.5. SISTEMAS DE ELONGACION MICROSOMAL .....	159
3.6. SISTEMAS DE DESATURACION MICROSOMAL .....	164
3.7. CADENAS DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL .....	169
4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	175
<b>DISCUSION</b> .....	<b>176</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>206</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>211</b>

## ABREVIACIONES

- ACBP: Proteínas transportadoras de grupos acilo
- ACC: Acetil-CoA carboxilasa
- ACP: Proteína transportadora de acilos del complejo ácido graso sintasa
- ADP: Adenosín difosfato
- AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
- apo: Apoproteína
- ATP: Adenosín trifosfato
- BFB: bezafibrato
- BHT: Butilhidroxitolueno
- BSA: Albúmina sérica bovina
- CFB: Clofibrato
- CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50
- cit: citosol
- CoA: coenzima A
- CMC: Concentración micelar crítica
- CPM: Cuentas por minuto
- DEHP: Di(2-etilhexil)ftalato
- DHEA: Dihidroepiandrosterona
- DTNB: Acido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
- DTT: Ditiotreitól
- E: extinción
- EDTA: Acido etilendiamino tetracético
- FABP: Proteínas transportadoras de ácidos grasos
- FAD: Flavín adenín dinucleótido
- FAS: Complejo ácido graso sintasa
- FFD: Dieta libre en grasas
- 6PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa
- F<sub>pD</sub>: NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa
- F<sub>pT</sub>: NADPH citocromo c reductasa

GFB: Gemfibrozilo  
GK: Glucocinasa  
G6P: Glucosa 6-fosfato  
G6PDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa  
GPO: Glicerofosfato oxidasa  
GSH: Glutation  
HDL: Lipoproteína de alta densidad  
HMG-CoA RD: Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa  
IDL: Lipoproteína de densidad intermedia  
LCAT: Lecitin colesterol aciltransferasa  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
LPL: Lipoproteinlipasa  
min: Minutos  
ML: Mitocondrias ligeras  
MP: Mitocondrias pesadas  
Ms: Microsomas  
NAD: Nicotinamida dinucleótido (forma oxidada)  
NADH: Nicotinamida dinucleótido (forma reducida)  
NADH Cb<sub>5</sub> Rd: NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa  
NADH CC Rd: NADH citocromo c reductasa  
NADP: Nicotinamida dinucleótido fosfato (forma oxidada)  
NADPH: Nicotinamida dinucleótido fosfato (forma reducida)  
NADPH CC Rd: NADPH citocromo c reductasa  
nmol: Nanomoles  
PCH: palmitoil-CoA hidrolasa  
PCS: Palmitoil-CoA sintetasa  
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride  
p/p: peso/peso  
QM: Quilomicrones  
rpm: Revoluciones por minuto  
TCA: Acido tricloroacético  
THF: Tetrahidrofurano  
UV: ultravioleta

**v/v: volumen/volumen**

**TMD: N, N, N', N'- tetrametiletildiamina**

**Tris: Tris(hidroximetil)aminoetano**

**VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad**

## **INTRODUCCION**

La arteriosclerosis es un enfermedad vascular muy frecuente en la sociedad occidental, caracterizada por el depósito de colesterol en la capa íntima de la pared arterial, que originan la disminución de su luz. Ello conduce a alteraciones en la reología y hemodinámica que desembocan con frecuencia en accidentes vasculares como el infarto agudo de miocardio. Actualmente la arteriosclerosis constituye la principal causa de muerte en los países industrializados. Se considera un proceso multifactorial para el que se conocen un gran número de factores de riesgo, como se indica en la Tabla I.1. (Carmena y col., 1989; Monfort y col., 1989).

De entre todos ellos, el factor más importante es la presencia de hiperlipoproteinemias o dislipemias, sobre todo aquellas que se caracterizan por aumentos en los niveles de colesterol-LDL. Las dislipemias están asociadas fundamentalmente a las fases avanzadas de la arteriosclerosis (Gómez Gerique, 1991). Respecto al inicio de la lesión ateromatosa, una de las hipótesis más aceptadas en la actualidad es que la modificación oxidativa de las LDL conduce, tras su captación por receptores no regulables de los macrófagos, a la formación de células espumosas, con el consiguiente depósito de colesterol en la íntima arterial (Plane y col., 1992). Evidentemente, cuando existe una hiperlipemia, la probabilidad de que las lipoproteínas sean modificadas aumenta, y cuando se suman ambos efectos, la aterogenicidad de las lipoproteínas se ve altamente potenciada (Gómez Gerique, 1991)

Está, pues, perfectamente establecida la relación directa existente entre la hipercolesterolemia y la enfermedad coronaria, en tanto que el valor de la hipertrigliceridemia como factor de riesgo cardiovascular no resulta tan claro. Sin embargo, cada vez más estudios muestran la importancia de este factor en el desarrollo de la arteriosclerosis, sobre todo si se tiene en cuenta que existe una relación inversa entre los niveles de triglicéridos y de colesterol-HDL, de reconocida capacidad antiaterogénica (Schwandt, 1991).

**Tabla I.1. Factores de riesgo de la arteriosclerosis**

<b>Modificables</b>	<b>No modificables</b>
<b>Factores intrínsecos</b>	
<b>a. con probable beneficio:</b>	
1. Hipercolesterolemia (aumento de col-HDL)	Sexo
2. Niveles bajos de col-HDL y otras anomalías del me- tabolismo lipídico	Edad
3. Hipertensión arterial	Antecedentes familia- res de arteriosclero- sis precoz
4. Obesidad	
<b>b. con incierto beneficio:</b>	
1. Diabetes mellitus	
2. Hiperfibrinogemia	
<b>Factores extrínsecos:</b>	
<b>a. con demostrado beneficio:</b>	
1. Tabaquismo	
<b>b. con probable beneficio:</b>	
1. Sedentarismo	
2. Alimentación (colesterol y ác. grasos saturados)	

La intervención médica sobre las hiperlipidemias, si consigue reducir los niveles plasmáticos de colesterol, va acompañada de una disminución en la incidencia del infarto de miocardio (Gómez Gerique, 1991). Sin embargo, no existe un criterio estricto sobre el momento en que debe realizarse esta intervención. En la siguiente tabla se muestran los criterios recomendados por la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Alvarez -Sala y col., 1990), en

las que se tienen en cuenta no solo los valores de colesterol total sino también los de col-LDL y col-HDL.

**Tabla I.2. Recomendaciones de la Sociedad Española de Arteriosclerosis**

<b>Colesterol total</b> Niveles entre 200-300 mg/dl (5,2-7,8 mmol/l)	
A. LDL-C < 150 mg/dl (3,8 mmol/l)	No intervención.
B. LDL-C de 150-185 mg/dl (3,8-4,8 mmol/l)	Recomendar dieta. Actuar sobre otros factores de riesgo.
C. LDL-C > 185 mg/dl (4,8 mmol/l)	Actuar como en B. Si persisten esos niveles, plantear tratamiento farmacológico.
<b>Colesterol-HDL (HDL-C) &lt; 35 mg/dl (0,9 mmol/l)</b>	
D. LDL-C < 150 mg/dl (3,8 mmol/l)	Abandonar el tabaco y practicar ejercicio. Actuar sobre los otros factores de riesgo.
E. LDL-C > 150 mg/dl (3,8 mmol/l)	Actuar como en D. Si persisten los niveles anormales de LDL-C y HDL-C, considerar tratamiento farmacológico en casos de alto riesgo.
<b>Triglicéridos totales (entre 200 y 500 mg/dl, 2,3-5,6 mmol/l)</b>	
F. LDL-C < 150 mg/dl (3,8 mmol/l)	Descartar hipertrigliceridemia secundaria. Recomendar dieta y ejercicio, reducir sobrepeso, moderar la ingesta de alcohol. Si persiste la elevación, decidir en función al riesgo individual.
G. LDL-C > 150 mg/dl (3,8 mmol/l)	Actuar como en F. Si persiste LDL-C alto, actuar como en B o C, según niveles de LDL-C.
<b>Colesterol total &gt; 300 mg/dl (7,8 mmol/l) y/o Triglicéridos totales &gt; 500 mg/dl (5,6 mmol/l)</b>	
Enviar a un Centro especializado para estudio si persisten esos niveles después de un tratamiento dietético riguroso.	

Como puede observarse en la anterior tabla, las primeras medidas a aplicar son las de tipo dietético, junto con la eliminación de hábitos nocivos como pueden ser el tabaquismo o el sedentarismo. Sin embargo, en muchas ocasiones estas medidas no son suficientes debiéndose entonces recurrir al tratamiento farmacológico. Entre los fármacos utilizados para el tratamiento farmacológico de las hiperlipoproteinemias, el de los fibratos constituye un grupo muy importante, por su amplio espectro de utilización. En la Tabla I.3 se muestran los fibratos disponibles actualmente en España, con sus correspondientes nombres comerciales:



**Tabla I.3. Fibratos disponibles en el mercado farmacéutico español**

Nombre genérico	Nombre registrado	Presentación	Dosis diaria
Alufibrato	Arteriobrate	500 mg	1000-2000 mg
Bezafibrato	Eulitop	200 mg	400-600 mg
	Difaterol	200 mg	400-600 mg
	Reducterol	200 mg	400-600 mg
	Eulitop retard	400 mg	400-600 mg
	Difaterol retard		
Binifibrato	Biniwass	600 mg	1.800 mg
Clofibrato	Neo-Atromid	500 mg	1000-1500 mg
	Davistar	300 mg	600-1200 mg
Etofibrato	Afloyán	300 mg	900 mg
Fenofibrato	Liparisón	100 mg	300 mg
	Secalip	100 mg	300 mg
	Lipovás	100 mg	300 mg
	Liparisón retard	250 mg	250 mg
	Secalip retard	250 mg	250 mg
		100 mg	100 mg
Gemfibrozilo	Lopid	300 mg	1200 mg
	Trialmin	300 mg	1200 mg
	Dccreclip	300 mg	1200 mg
	Bolutol	300 mg	1200 mg

A parte de su amplia utilización en la terapéutica actual de las hiperlipoproteinemias, el interés que nos ha movido a la realización de este trabajo, y de otros anteriores, es que aunque su eficacia como hipolipemiantes es evidente, todavía no se conoce con exactitud cual es mecanismo o los mecanismos responsables de este efecto. Algunos de los mecanismos que se han propuesto son:

- inhibición de la síntesis de VLDL
- estimulación del catabolismo de las VLDL, por activación de las lipoproteinlipasas periféricas
- inhibición de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa y estimulación de la expresión de los receptores hepáticos de LDL.

Sin embargo, los mecanismos bioquímicos responsables del desencadenamiento de estos procesos no son tan claros. En este sentido, parece lógico que la composición en ácidos grasos de los glicerolípidos celulares juegue un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas, dado que:

- . los ácidos grasos insaturados disminuyen la producción de VLDL (Salam y col., 1989; Debry y Pelletier, 1991)

- . la actividad lipoproteinlipasa se ve incrementada en función del grado de insaturación de los ácidos grasos de los glicerolípidos de las VLDL (Desreumaux y col., 1979)

- . los ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico, modulan la actividad LCAT y la transferencia de ésteres de colesterol (Lagrost y col., 1991); asimismo, inhiben la unión de LDLs al receptor apo B/E hepático e incrementan la afinidad de este receptor para las VLDL y quilomicrones remanentes (Bihain y col., 1989).

Por todo ello, resulta de gran interés el estudio de las posibles modificaciones que los fibratos puedan ejercer sobre las vías de síntesis de ácidos grasos en el hígado (esquema pg. 9). Desde hace años, se han venido publicando numerosos trabajos sobre el efecto de los fibratos sobre enzimas relacionados con la biosíntesis lipídica (véase las completas revisiones de Reddy y Lalwani, 1983, y de Hawkins y col., 1987). Sin embargo, la mayoría de estos estudios presentan ciertos inconvenientes que dificultan una clara comprensión del mecanismo de acción hipolipemiante:

- estudian únicamente el efecto del clofibrato, considerado el fármaco

prototipo de este grupo, pero que, debido a la alta incidencia de efectos secundarios, va siendo gradualmente substituido por otros, como bezafibrato y gemfibrozilo, quedando su uso restringido al la hiperlipoproteinemia tipo III

- habitualmente, los estudios se limitan a un único tiempo, después de 7 o 15 días de tratamiento, obviando la evolución temporal de las actividades enzimáticas estudiadas

- aunque los fibratos se comportan como potentes proliferadores peroxisómicos en ratas, pocos autores relacionan las modificaciones halladas en las actividades enzimáticas estudiadas con el fenómeno de la inducción peroxisómica

- por último, existe un gran vacío de información respecto al efecto *in vitro* de estos fármacos sobre las actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis lipídica.

Durante los últimos cuatro años, en el Departamento de Farmacología y Farmacognosia de esta Facultad, se ha venido investigando sobre el efecto de tres fibratos, clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo en las actividades enzimáticas relacionados de forma directa con la síntesis hepática de los ácidos grasos. Este trabajo se inició con el estudio del efecto *in vitro* de dichos fármacos, estudio que ha constituido la Tesis Doctoral de Dña. Rosa M<sup>a</sup> Sánchez Peñarroya (Alegret y col., 1991; Sánchez y col., 1992 a y b y 1993 a y b). En esta etapa previa, se han estudiado las acciones *in vitro* de clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo sobre diversos enzimas citosólicos y microsomales, que aparecen en el esquema de la página 9. Asimismo, se han determinado las condiciones óptimas de valoración de estos enzimas, y, en los casos en que se detectó alguna modificación importante en sus actividades, se procedió a su estudio cinético. Como principales conclusiones de esta etapa podemos citar:

1. De las actividades enzimáticas estudiadas, sólo la NADH citocromo c reductasa resultó estimulada *in vitro* por los fibratos, mientras que las restantes, o bien no resultaron modificadas (NADPH citocromo c

reductasa, NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa, ATP citrato liasa, málico deshidrogenasa, delta-9 desaturasa) o fueron inhibidas con mayor (acetil-CoA carboxilasa, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, acil-CoA hidrolasa, elongación microsomal) o menor intensidad (acil-CoA sintetasa, ácido graso sintasa, enzima málico, delta-5 y -6 desaturasas).

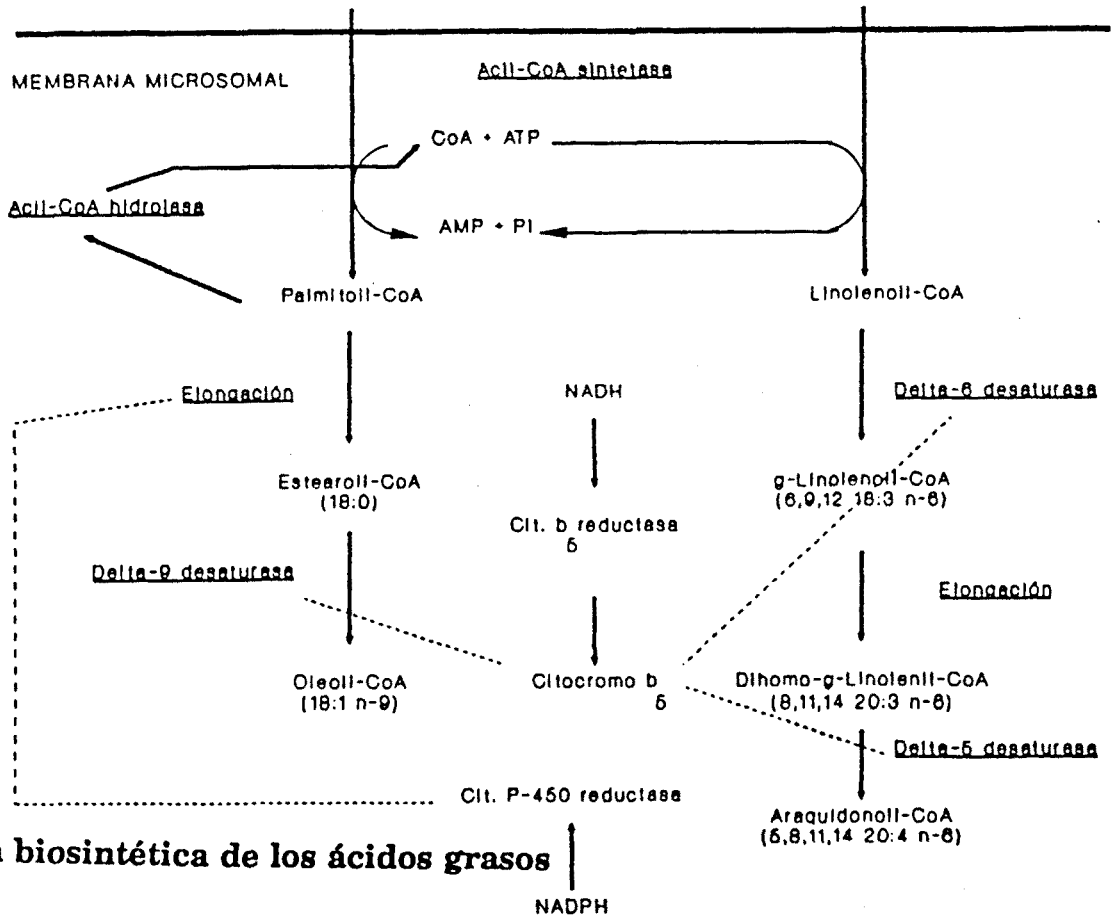
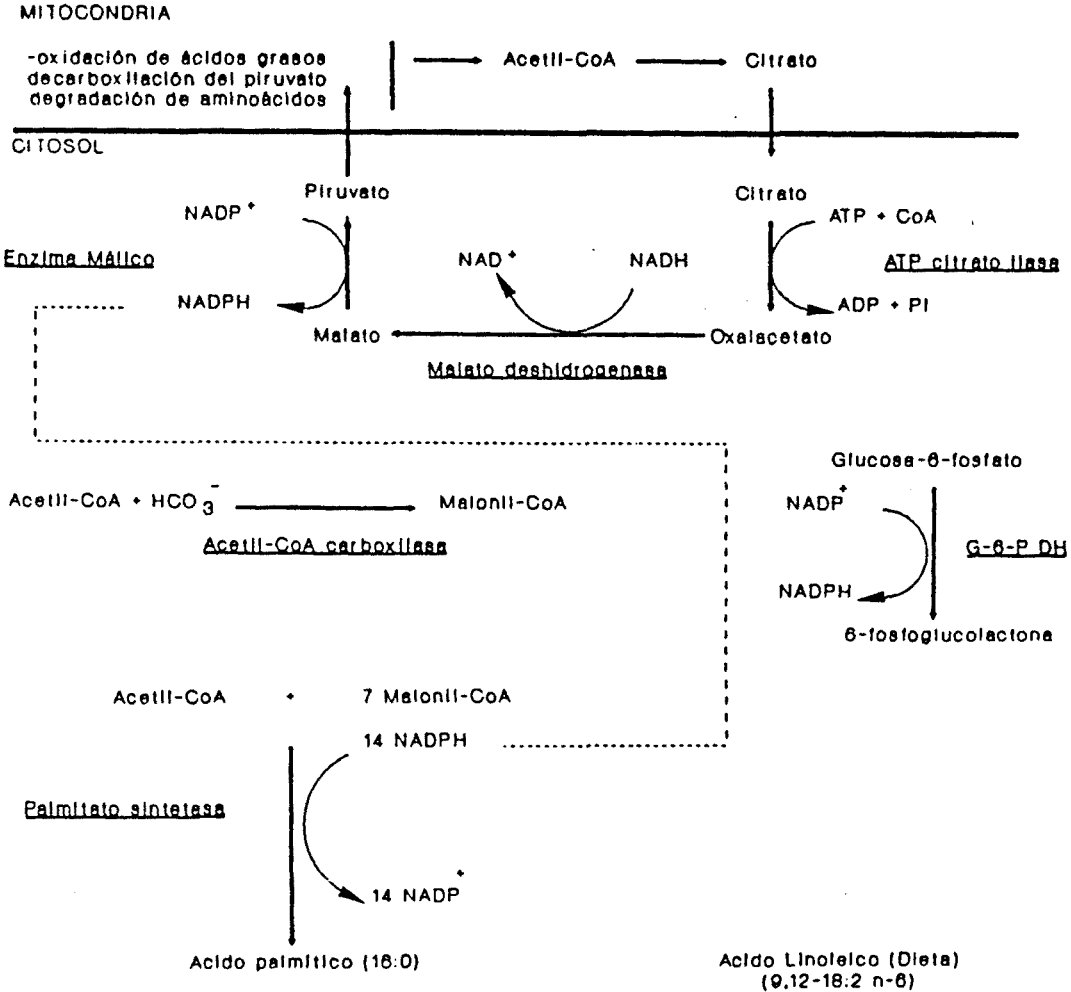
2. Siempre que se detectó una modificación en alguna actividad enzimática, el orden de potencia farmacológica fue GFB>BFB>CFB

3. Las CI<sub>50</sub> calculadas, permiten suponer, para ciertos enzimas, como acil-CoA hidrolasas o elongasas de ácidos grasos, una repercusión de la inducción detectada *in vitro* tras la administración de estos fármacos *in vivo*. Esto es aún más cierto en el caso del gemfibrozilo, que, además de ser el que presenta CI<sub>50</sub> más bajas, tiene una clara tendencia a la acumulación en el hígado.

Como continuación de este trabajo, la presente Tesis se ha centrado en el estudio del efecto *in vivo* de clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo, sobre las mismas actividades enzimáticas estudiadas anteriormente *in vitro*. Para ello se ha procedido a tratar las ratas durante 15 días con dichos fármacos y a estudiar, en distintos tiempos (días 1, 2, 4, 7, 10 y 15), el efecto de los mismos, con el objeto de establecer la evolución temporal de las actividades enzimáticas. Los enzimas estudiados han sido los siguientes:

- $\beta$ -oxidación peroxisómica
- Palmitoil-CoA hidrolasas: microsomal, citosólica y de mitocondrias pesadas y ligeras
- Palmitoil-CoA sintetasa microsomal
- Elongasas microsomales de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados
- Delta-9, delta-5 y delta-6 desaturasas de ácidos grasos
- Cadenas de transporte electrónico microsomal (NAD(P)H citocromo

Tal y como hemos comentado anteriormente, la mayoría de los estudios publicados tienden a omitir la relación entre las modificaciones producidas por los fibratos sobre las actividades enzimáticas y el fenómeno de la inducción peroxisómica producida por estos fármacos en ratas o ratones. A nuestro entender, esta relación es de vital importancia, dado que si se confirma la dependencia de ambos efectos, es difícilmente esperable que la modificación hallada en rata pueda reproducirse en humanos, que son muy poco sensibles a la proliferación peroxisómica (Latruffe, 1992). Para intentar superar esta falta de información, hemos recurrido a dos estrategias distintas: la primera, de tipo matemático, es el establecimiento de correlaciones entre las actividades enzimáticas estudiadas y la  $\beta$ -oxidación peroxisómica, de forma que, si la hay, el coeficiente de correlación hallado pueda darnos una idea sobre la importancia de la contribución de la inducción peroxisómica a la modificación de la actividad enzimática. Por otro lado, paralelamente a los estudios en rata, se han realizado ensayos en cobaya, que, de forma similar al hombre, es poco sensible al fenómeno de la proliferación peroxisómica (Driven y col., 1993). Con la comparación de los estudios *in vivo* en rata y cobaya, y con su relación con los estudios previos realizados *in vitro* se ha pretendido arrojar un poco de luz sobre los complejos efectos de los fibratos, en concreto clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo, sobre los enzimas hepáticos relacionados con la síntesis y transformación de los ácidos grasos.



**Ruta biosintética de los ácidos grasos**



## **PARTE TEORICA**





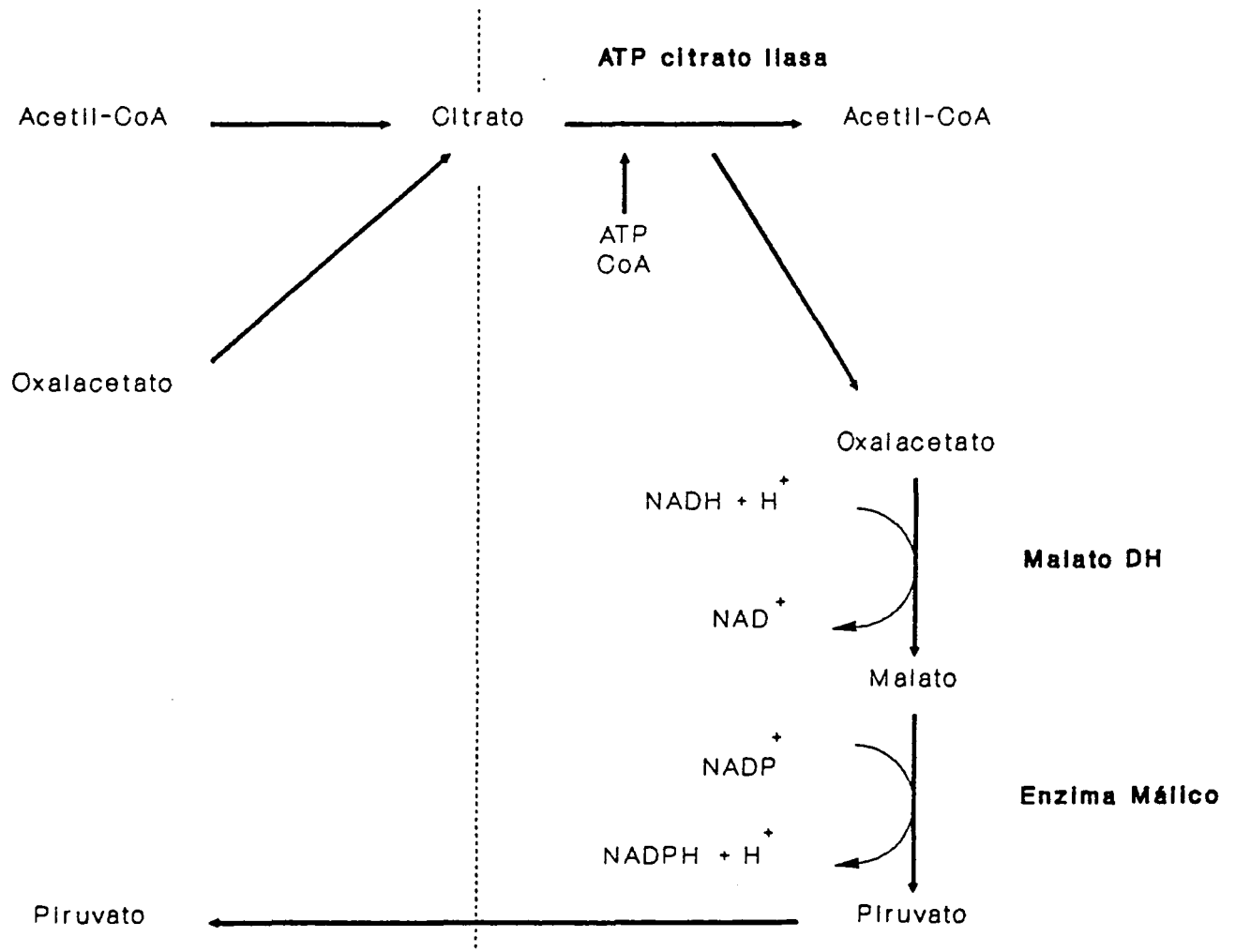
## I. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

La biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga en células de mamíferos implica: 1) síntesis *de novo* por el sistema ácido graso sintasa citosólica, que da lugar a ácido palmítico como principal producto; y 2) elongación de los ácidos grasos obtenidos tanto por síntesis *de novo* como a través de la dieta por adición sucesiva de unidades de dos carbonos (Murad y Kishimoto, 1978), alternándose con la desaturación de los mismos.

### 1. SÍNTESIS *DE NOVO*

En los organismos superiores, la síntesis de ácidos grasos tiene lugar por acción de un complejo multienzimático denominado ácido graso sintasa (FAS), de localización citosólica (Wakil y col., 1983).

Para iniciar la síntesis, es necesario transferir las moléculas de acetil-CoA desde la matriz mitocondrial (donde se forman por oxidación a partir de piruvato, aminoácidos o ácidos grasos) hasta el citosol. Dado que el acetil-CoA no puede atravesar la membrana mitocondrial debe reaccionar con oxalacetato y transformarse en citrato (Mead y col., 1986 a). El oxalacetato, una vez ha pasado al citosol, se escinde por acción de la ATP-citrato liasa, dando lugar a oxalacetato y acetil-CoA (Wells, 1991). Para entrar de nuevo en la mitocondria, el oxalacetato debe transformarse en piruvato, por la acción sucesiva de la malato deshidrogenasa y del enzima málico (Figura 1). Estos enzimas tienen además la función de proporcionar, junto con los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, los equivalentes en forma de NADPH necesarios para las etapas reductivas de la síntesis.



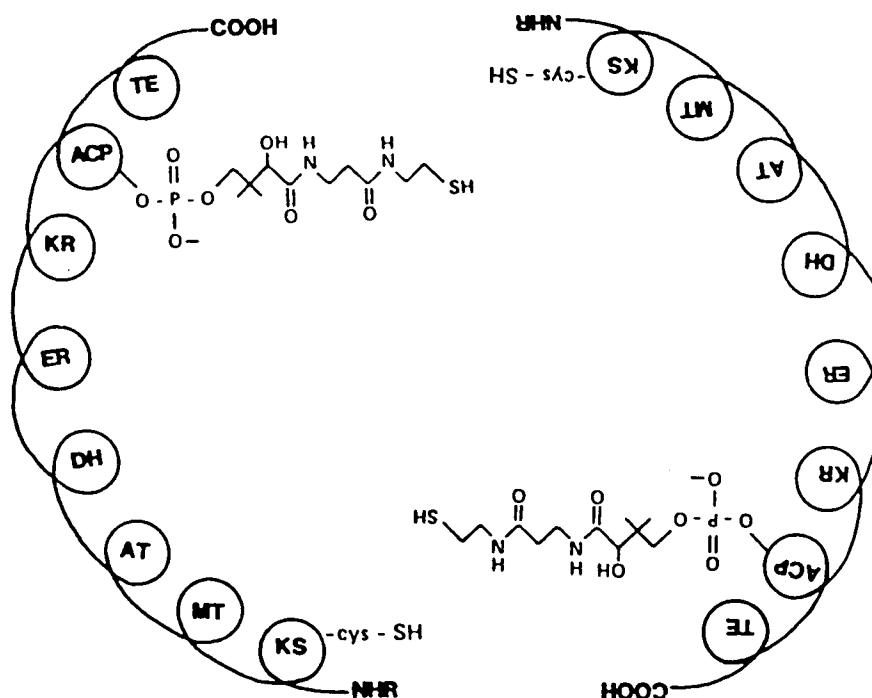
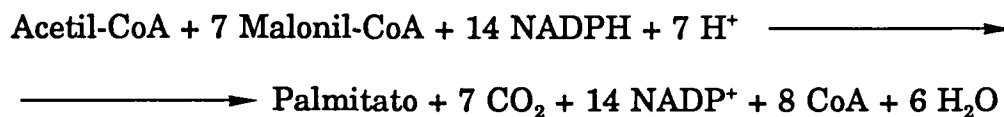
**FIGURA 1. Transporte de acetyl-CoA de la mitocondria al citosol**

El donador de átomos de carbono para la formación de ácidos grasos por el complejo FAS es el malonil-CoA, cuya síntesis se realiza en el citosol a partir de acetil-CoA y  $\text{HCO}_3^-$  por acción de la acetil-CoA carboxilasa. Esta reacción es la etapa limitante de la biosíntesis de ácidos grasos. La carboxilación del acetil-CoA tiene lugar en dos etapas: en la primera se forma un intermediario de carboxibiotina a expensas de un ATP, y en la segunda el grupo  $\text{CO}_2$  se transfiere al acetil-CoA para formar malonil-CoA (Alberts y Vagelos, 1972). La actividad acetil-CoA carboxilasa está regulada por citrato, ácidos grasos de cadena larga y por un mecanismo de fosforilación reversible (Hardie, 1989).

A partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, el complejo FAS lleva a cabo la síntesis de ácido palmítico. En los animales, la forma activa de este complejo enzimático es un homodímero formado por dos subunidades idénticas. Cada subunidad consta de siete enzimas: acetil transacilasa, malonil transacilasa,  $\beta$ -cetoacil sintetasa,  $\beta$ -cetoacil reductasa, deshidratasa, enoil reductasa y tioesterasa (Wakil y col., 1983). En el centro se encuentra una proteína transportadora de grupos acil (ACP), a la cual se unen los intermediarios de la síntesis a través del grupo sulfhidril terminal de su grupo prostético de fosfopanteína. Aunque cada subunidad contiene todos los sitios catalíticos requeridos para la síntesis de ácido palmítico, el monómero carece de actividad  $\beta$ -cetoacil sintetasa. Esta actividad enzimática requiere la yuxtaposición del grupo cisteína-SH de la  $\beta$ -cetoacil sintetasa con el grupo fosfopanteína-SH de la ACP de la otra subunidad, de manera que las dos subunidades estén dispuestas cabeza-cola (Figura 2) (Tsukamoto y col., 1983).

La fase inicial de la síntesis es la unión de acetil-CoA y malonil-CoA a la ACP, reacciones catalizadas por la acetil-transacilasa y la malonil-transacilasa, respectivamente. A continuación, por acción de la  $\beta$ -cetoacil sintetasa, se produce la condensación de ambos para dar acetoacetil-ACP, liberándose  $\text{CO}_2$ . Las tres etapas siguientes son reducción del acetoacetil-ACP a D-3-hidroxiacetil-ACP, deshidratación de éste a crotonil-ACP, y segunda

butiril desde la ACP a la  $\beta$ -cetoacil-CoA sintetasa y su condensación con un nuevo malonil-ACP. Después de un total de siete ciclos, se obtiene palmitoil-ACP, sobre el que actúa la tioesterasa, liberándose ácido palmítico. El proceso de finalización de la síntesis de ácidos grasos está marcado por la tioesterasa, que presenta la máxima actividad para tioésteres de 16 carbonos (Wakil, 1989). La ecuación global de la síntesis del ácido palmítico por la ácido graso sintasa citosólica es:



**FIGURA 2. Representación esquemática de los dos polipéptidos multifuncionales de la ácido graso sintasa**

Las abreviaciones para las actividades parciales son: AT: acetil transacilasa, MT: malonil transacilasa, KS:  $\beta$ -cetoacil sintetasa, KR:  $\beta$ -cetoacil reductasa, DH: deshidratasa, ER: enoil reductasa, TE: tioesterasa y ACP: proteína transportadora de acilos.

## **2. ACIL-CoA HIDROLASAS Y ACIL-CoA SINTETASAS**

Para poder ser elongados y desaturados, los ácidos grasos deben ser activados a sus correspondientes tioésteres, por acción de un enzima llamado acil-CoA sintetasa, mientras que otro enzima, la acil-CoA hidrolasa, cataliza justamente la reacción contraria. La cantidad de acil-CoAs presente en cada tejido puede ser controlada por el balance existente entre ambas actividades (Waku, 1992). Por su importancia en el control de la disponibilidad de substratos para la elongación y desaturación, detallaremos algunas de las características de estos enzimas.

### **2.1. Acil-CoA sintetasa**

La acil-CoA sintetasa cataliza la conversión de ácidos grasos libres en derivados CoA utilizando ATP como fuente energética. La reacción transcurre por un mecanismo ping-pong, en el que, en una primera etapa, el enzima, el ácido graso y el ATP forman un complejo, el cual entonces reacciona con el CoA para dar acil-CoA y AMP (Waku, 1992). La acil-CoA sintetasa tiene un papel tan esencial como dador de acil-CoAs en la biosíntesis lipídica, acilador de proteínas y regulador de muchos procesos metabólicos, que su inhibición sería letal para los sistemas animales (Tomoda y col., 1991). La importancia fisiológica de la acil-CoA sintetasa para el metabolismo de los ácidos grasos se demuestra por el hecho de que el nivel de RNAm correspondiente se halla elevado unas 7-8 veces en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en hidratos de carbono (Suzuki y col., 1990). El hígado es el órgano que presenta mayor actividad sintetasa en todo el rango de longitud de cadena de los ácidos grasos (Waku, 1992).

Existen diversas acil-CoA sintetastas con especificidad de substrato según la longitud de la cadena carbonada: la palmitoil-CoA sintetasa o sintetasa de ácidos grasos de larga cadena (LCFA-CoA sintetasa) utiliza como substratos los ácidos grasos de 12 a 22 átomos de carbono; la lignoceroil-CoA

sintetasa, en cambio, actúa sobre ácidos grasos de más de 22 carbonos, y por ello se denomina también sintetasa de ácidos grasos de muy larga cadena (VLCFA-CoA sintetasa) (Singh y Poulos, 1988; Lazo y col., 1990).

La localización de ambas enzimas es distinta, pues si bien la palmitoil-CoA sintetasa se encuentra en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático (siempre en la parte externa o citosólica de éstos orgánulos), la lignoceroil-CoA sintetasa es únicamente de localización peroxisómica o microsomal (Lazo y col., 1990). Las características de la sintetasa de ácidos grasos de larga cadena (composición de aminoácidos, peso molecular, propiedades catalíticas y cinéticas) son idénticas independientemente de su localización en la célula (Tanaka y col., 1979). La especificidad de sustrato también es la misma, activándose los ácidos grasos saturados de 10 a 20 C y los insaturados de 16 a 20 C (Waku, 1992).

El destino de los acil-CoA depende del compartimento intracelular donde se han sintetizado. Así, los formados en los microsomas se utilizan principalmente para la síntesis de lípidos complejos, como glicerolípidos y fosfolípidos, en el retículo endoplasmático (Singh y Poulos, 1988). En cambio, las acil-CoA sintetasas de localización peroxisómica o mitocondrial proporcionan los sustratos para la  $\beta$ -oxidación en estos orgánulos.

## **2.2. Acil-CoA hidrolasa**

Como ya se ha dicho, la acil-CoA hidrolasa, realiza la acción contraria a la de la sintetasa, catalizando la ruptura del enlace tioéster de los acil-CoA de 7 a 18 átomos de carbono (Berge y col., 1981). Por tanto, su actuación resta sustrato para la elongación y la desaturación. Aunque el significado fisiológico no está claro, parece ser que el cerebro presenta actividades hidrolasa muy altas, 15 veces superiores a las del hígado (Waku, 1992).

En hígado se han identificado tres acil-CoA hidrolasas distintas,

localizadas en microsomas, mitocondrias y peroxisomas (Waku, 1992). Las acil-CoA hidrolasas de microsomas y mitocondrias reciben también el nombre genérico de palmitoil-CoA hidrolasas, pues su actividad es máxima con este ácido graso como sustrato.

La palmitoil-CoA hidrolasa microsomal es un monómero de peso molecular 59000 D, asociado a membrana pero que no forma parte integral de la misma. Se caracteriza por la existencia de tres grupos sulfhidrilo: uno de los ellos, que forma parte de un residuo de serina, resulta negativamente afectado por la presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ; está expuesto al medio y parece esencial para la actividad enzimática. Los otros dos grupos sulfhidrilo forman parte de residuos de cisteína y parecen necesarios para el mantenimiento de una conformación enzimática activa (Berge, 1980).

La palmitoil-CoA hidrolasa mitocondrial también ha sido purificada (Berge, 1980). Su peso molecular es de 19000 D, y a diferencia del enzima microsomal se inhibe por  $Ca^{2+}$  y se activa ligeramente por  $Mg^{2+}$ . Además, presenta distintas propiedades respecto a la inactivación térmica y  $K_m$  para el palmitoil-CoA. En mitocondrias de tejido adiposo en hámster se han descrito también acil-CoA hidrolasas específicas para ácidos grasos de corta (C3) y media (C10) cadena (Waku, 1992).

Respecto a la acil-CoA hidrolasa citosólica, si bien su actividad es muy baja en condiciones normales, después del tratamiento con fibratos se incrementa enormemente (Katoh y col., 1987), debido a la inducción de dos nuevas acil-CoA hidrolasas citosólicas llamadas I y II. Estas son diferentes de los enzimas microsomal y mitocondrial (Miyazawa y col., 1981), y también son distintas entre sí, pues poseen distintos pesos moleculares (72000 y 40000, respectivamente), resultan afectadas de forma distinta por cationes y por BSA y difieren ligeramente en cuanto a la especificidad de sustrato (Kawashima y col., 1983). A diferencia de lo sucedido en hígado, las acil-CoA hidrolasas de citosol de cerebro y testículos no resultan inducidas por el tratamiento de



ratas con clofibrato, aunque debe tenerse en cuenta que estas actividades son de por sí muy altas en ratas control (Katoh y col., 1987). Es interesante constatar que las propiedades de la hidrolasa citosólica hepática I son muy similares en cuanto a peso molecular, cinética y estabilidad térmica a las hidrolasas del citosol de cerebro y testículos de rata (Katoh y col., 1987)

La cinética de la reacción catalizada por las acil-CoA hidrolasas es compleja, pues los substratos de estas enzimas son lípidos anfipáticos que tienen capacidad de formar micelas. Estas micelas son inhibitorias, y alejan al enzima del clásico comportamiento michaeliano (Gatt y Bartfai, 1977). Sólo los monómeros de acil-CoAs libres, cuya concentración es esencialmente constante por encima de la concentración micelar crítica, actúan como verdaderos substratos (Berge y col., 1987). Por ello resulta necesaria la utilización de albúmina en el ensayo, pues ésta, al absorber parte del substrato, provoca una disminución de la concentración de micelas inhibitorias, lo que comporta el incremento de la actividad enzimática. La relación óptima substrato/proteína es 120 nmol de palmitoil-CoA / mg de proteína (BSA + proteína enzimática) (Sánchez y col., 1992). A esta concentración óptima, las micelas desaparecerían, pero si la albúmina está en exceso, incluso los monómeros pueden llegar a absorberse a ella, disminuyendo entonces la velocidad de reacción (Gatt y Bartfai, 1977).

El entorno hidrofóbico de la acil-CoA hidrolasa microsomal resulta ventajoso para la actividad del enzima, pues el substrato es accesible al enzima gracias a la interacción de su forma monomérica con la zona hidrofóbica de éste (Berge y col., 1981).

### **3. ELONGACION DE ACIDOS GRASOS**

Como ya se ha expuesto, en las células de mamífero los ácidos grasos de cadena larga se obtienen bien a través de la dieta o a través de la elongación de los ácidos grasos ya preformados (en forma de acil-CoA) por

adición sucesiva de dos átomos de carbono.

Existen dos sistemas enzimáticos de elongación de ácidos grasos localizados respectivamente en los microsomas y en las mitocondrias del hígado. Se ha postulado también la existencia de un sistema de elongación de ácidos grasos localizado en los peroxisomas (Horie y col., 1989), con preferencia para la elongación de acil-CoAs de cadena media, pero cuya existencia es discutida por otros autores (Nagi y col. 1986).

El sistema mitocondrial se caracteriza por ser el acetil-CoA el donador de carbonos, y porque la elongación se produce por la actuación de forma reversa de los enzimas de la  $\beta$ -oxidación (ver capítulo II), junto con la NADPH-enoil-CoA reductasa (Podack y Seubert, 1972; Horie y col., 1989), que cataliza la última etapa del proceso. Como cofactores para las etapas reductoras se necesitan tanto NADH como NADPH (Hinsch y col., 1976). La máxima actividad es para los acil-CoAs de cadena media, mientras que prácticamente no presenta actividad con palmitoil-CoA o estearoil-CoA (Hinsch y col., 1976). De todos modos, tanto la elongación mitocondrial como la peroxisómica, si es que existe, son muy poco activas, siendo el sistema microsomal el más eficaz para la elongación de ácidos grasos.

En el caso de la elongación microsomal, los equivalentes reductores que se necesitan pueden proceder tanto del NADH como del NADPH. Si el sistema utiliza NADH, los electrones fluyen a través de la NADH citocromo  $b_5$  reductasa y el propio citocromo  $b_5$  hasta el enzima correspondiente. Si el cofactor es el NADPH, los electrones se transfieren vía NADPH citocromo P450 reductasa, y a partir de ésta pueden pasar a través del citocromo  $b_5$  o de un intermediario desconocido, o bien directamente a la elongasa, pero nunca a través del citocromo P450 (Ilan y col., 1981).

La elongación microsomal de ácidos grasos no está catalizada por un sistema multienzimático sino por una serie de enzimas discretos (Bernert y

Sprecher, 1977), que actúan de forma secuencial (Figura 3):

### 1) Enzima de condensación

La primera etapa del proceso de elongación de los ácidos grasos es la condensación de un acil-CoA con malonil-CoA para obtener un derivado  $\beta$ -cetoacil-CoA.

La velocidad de condensación es equivalente a la velocidad total del proceso de elongación, y es mucho menor que la velocidad de las siguientes reacciones (Sprecher, 1981). Así pues, la condensación es la etapa velocidad limitante del proceso de elongación, y se caracteriza por presentar un alto grado de especificidad de sustrato (Bernert y Sprecher, 1977). Estos mismos autores proponen la existencia de al menos dos enzimas de condensación distintos, uno para ácidos grasos saturados y otro para poliinsaturados. Prasad y col. (1986) van más allá, postulando la existencia de tres sistemas de condensación distintos, uno para acil-CoAs saturados, otro para monoinsaturados, y un tercero para poliinsaturados. La existencia de múltiples enzimas de condensación se ha visto también confirmada por estudios que demuestran que la regulación hormonal de cada uno de ellos es distinta (Suneja y col., 1990). Se acepta, pues, que los microsomas contienen múltiples enzimas de condensación, pero todos ellos dirigen sus productos hacia un único conjunto de enzimas que catalizan las restantes etapas del proceso (Nagi y col., 1986).

Además de depender del grado de insaturación del sustrato utilizado, la velocidad de condensación está también afectada por modificaciones en la dieta (Sprecher, 1981). Así, el ayuno produce una disminución de la velocidad de condensación, que vuelve a aumentar, poniéndose muy por encima de los valores control, al realimentar los animales con una dieta libre en grasas y rica en hidratos de carbono. En cambio, las restantes etapas de la elongación no están influenciadas por cambios dietarios o modificaciones de sustratos.

La velocidad de la reacción de condensación se incrementa cuando se adiciona albúmina al medio. El efecto de la albúmina es doble, pues por una parte incrementa la concentración micelar crítica de los acil-CoAs (sólo los monómeros y no las micelas son buenos sustratos para este enzima) y por otro lado actúa inhibiendo la  $\beta$ -cetotiolasa, que revertiría la reacción (Sprecher, 1981). Además, la albúmina también previene la inhibición por producto al unirse al  $\beta$ -cetoacil-CoA (Cinti y col., 1992; Bernert y Sprecher, 1978).

Un estudio de Osei y col. (1989), demostró que el enzima de condensación se localiza en la cara citoplasmática de la vesícula microsomal. Esto resulta totalmente lógico teniendo en cuenta que este enzima utiliza como sustratos los ácidos grasos activados como ésteres CoA, y el enzima encargado de esta activación, la acil-CoA sintetasa, presenta la misma topología.

Hasta el momento, todos los intentos de purificar el enzima de condensación han resultado sin éxito (Cinti y col., 1992).

## 2) $\beta$ -cetoacil-CoA reductasa

Cataliza la reducción del intermedio cetoacil para dar lugar a un  $\beta$ -hidroxiacil-CoA. Se ha demostrado que esta primera etapa reductora es el lugar de participación del citocromo  $b_5$  en el sistema de elongación microsomal (Nagi y col., 1983 a). Por otro lado, la NADPH citocromo P450 reductasa también se encuentra implicada únicamente en esta primera fase reductora, y no en la segunda (Nagi y col., 1983 b). En 1989, Nagi y col. describieron por primera vez la existencia de dos  $\beta$ -cetoacil-CoA reductasas distintas: una de ellas usa NADPH y la otra únicamente NADH. Los mismos autores señalan que si bien la reductasa específica para el NADH es inhibida por la albúmina, la NADPH-específica no es afectada, o incluso puede ser estimulada, por la adición de albúmina. La  $\beta$ -cetoacil-CoA reductasa se localiza en la cara

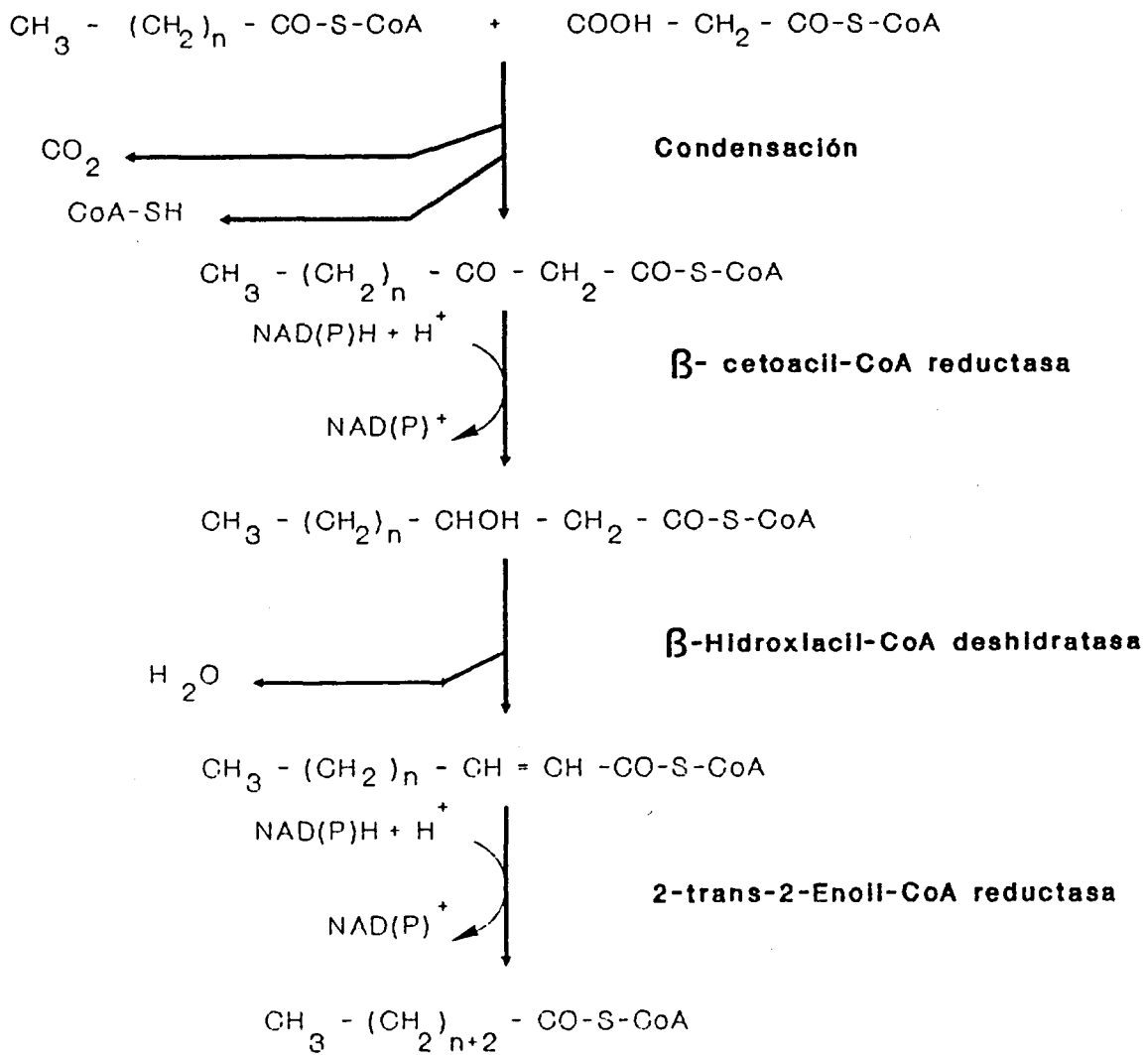
citoplasmática de la membrana microsomal, lo cual probablemente es necesario para que el enzima reciba los electrones de las cadenas de transporte electrónico, que tienen la misma localización (Osei y col., 1989).

### 3) $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidratasa

Con la eliminación de una molécula de agua se obtiene un intermedio que posee un doble enlace en configuración trans en la posición 2. A diferencia del enzima de condensación, el sustrato preferido para la deshidratasa son las micelas. Por eso su actividad específica no aumenta al adicionar albúmina al medio de incubación (Sprecher, 1981). Cook y col., (1985) demostraron la existencia de dos  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidratasa distintas, una para sustratos de cadena corta y otra para los de cadena larga (12-20 carbonos). La que actúa sobre sustrato de cadena larga se activa cuando se extrae de la membrana, pues está localizada de forma superficial, y es independiente de la deshidratasa de sustratos de larga cadena, la cual es un componente integral del sistema de elongación (Cook y col., 1985). A diferencia de los dos anteriores componentes del sistema de elongación, la deshidratasa parece estar incluida en la membrana microsomal, aunque su sitio activo debe estar próximo al de la  $\beta$ -cetoacil-CoA reductasa.

### 4) Trans-2-enoil-CoA reductasa

Cuando se purificó la trans-2-enoil-CoA reductasa, se obtuvieron dos fracciones, que se vio correspondían a dos enzimas distintos: uno de ellos es NADPH-específico, y actúa sobre sustratos de corta cadena (4-16 carbonos); el otro es activo tanto con NADH como con NADPH, aunque existe preferencia por el NADPH, y actúa sobre sustratos de cadena larga (Prasad y col., 1985). La reductasa específica de ácidos grasos de cadena corta no resulta afectada por la adición de albúmina, probablemente debido a que este tipo de ácidos grasos no forma micelas a las concentraciones utilizadas para la valoración de este enzima.



**FIGURA 3. Elongación microsomal de ácidos grasos**

Hay que señalar que ni el citocromo  $b_5$  ni la NADPH citocromo c reductasa participan en esta etapa reductora, de modo que parece ser que los electrones fluyen directamente desde el NADH o NADPH hasta el enzima (Nagi y col., 1983 a y b). El acceso a estos nucleótidos, que se generan en el citosol celular, es posible gracias a la localización del enzima en la cara citoplasmática de la membrana microsomal (Osei y col., 1989).

## **4. DESATURACION DE ACIDOS GRASOS**

### **4.1. Desaturasas**

En las células de mamíferos, los ácidos grasos insaturados se sintetizan por la desaturación oxidativa directa de ácidos grasos de cadena larga ya preformados (Jeffcoat, 1979). Los substratos para la desaturación pueden proceder de la dieta, o bien ser los productos de la ácido graso sintasa citosólica o de los sistemas de elongación microsomales.

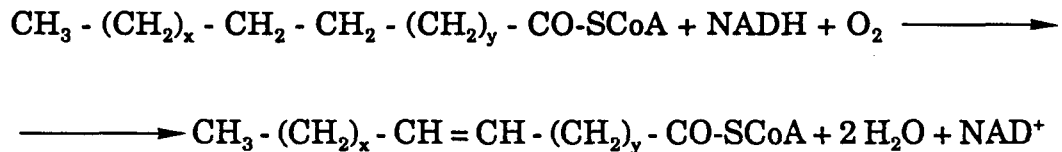
Los enzimas que catalizan la desaturación de los ácidos grasos, o desaturasas, se denominan de acuerdo con la posición en que introducen el doble enlace, contando a partir del extremo carboxílico de la cadena carbonada. En cambio, la clasificación de los ácidos grasos en "series", se hace de acuerdo con la posición del primer enlace contando a partir del extremo metílico.

Actualmente se considera que existen tres desaturasas distintas: delta-9, delta-6 y delta-5. Se había propuesto también la existencia de una delta-4 desaturasa, pero actualmente se considera que la obtención de 22:6 n-3 a partir de 20:5 n-3 tiene lugar por la existencia de un sistema de retroconversión de los ácidos grasos de muy larga cadena situado en los peroxisomas (Yoshida y Bourre, 1992). La aparente delta-4 desaturasa sería en realidad el conjunto de la elongación de 20:5 n-3 a 22:5 n-3 y a 24:5 n-3 seguida de la delta-6 desaturación de éste a 24:6 n-3 y la retroconversión, por

pérdida de dos carbonos, a 22:6 n-3.

Aparentemente, la delta-8 desaturasa no existiría (Sprecher, 1981), ya que la desaturación siempre se produce en las posiciones 5 o 6 y no en la 8. Aunque la delta-8 desaturación detectada en testículos de rata o en tumores (Jeffcoat, 1979) puede ser debida a una menor especificidad de la delta-9 desaturasa, algunos autores (Kawashima y col., 1990) son capaces de evidenciar la delta-8 desaturación de ácido 11,14-eicosadienoico a 8,11,14-eicosatrienoico.

Todas las desaturasas catalizan la desaturación directa de los acil-CoAs de acuerdo con la reacción general:



Las desaturasas tienen requerimiento absoluto de oxígeno molecular, que actúa como aceptor de un par de electrones, uno procedente del acil-CoA y el otro del cofactor reductor. Para esta función de cofactor se requiere un nucleótido de piridina, que puede ser NADPH o NADH, aunque generalmente éste último es más activo (Holloway, 19??). Además, todas las desaturasas actúan sobre substratos en forma de acil-CoA, al igual que las elongasas (ver punto 2.1); la excepción es la delta-5, que puede existir en dos formas en el hígado de mamíferos: una actúa sobre el gamma-linolenil-CoA y otra sobre un fosfolípido que contiene este ácido graso, dando lugar directamente a araquidonil-fosfatidilcolina (Jeffcoat, 1979).

Cuando el substrato es un ácido graso saturado, el primer doble enlace se introduce siempre entre los carbonos 9 y 10, por acción de la delta-9 desaturasa. A diferencia de las plantas, los animales no pueden introducir dobles enlaces más allá de la posición 9, de forma que los siguientes dobles



enlaces deberán introducirse entre el carbono 9 y el extremo carboxilo por acción de la delta-6 y la delta-5 desaturasa. Por ello, los animales son absolutamente dependientes de las plantas para obtener ácidos grasos con dobles enlaces en las posiciones 12, como el ácido linoleico (18:2 n-6) o 15, como el ácido alfa-linolénico (18:2 n-3), denominados ácidos grasos esenciales. A partir de éstos, los animales pueden sintetizar, utilizando alternadamente los sistemas de elongación y desaturación, ácidos grasos de 4 y 6 dobles enlaces, como el ácido araquidónico (20:4 n-6), principal precursor de prostanoïdes, y el ácido docosahexanoico (22:6 n-3), muy importante en el sistema nervioso central (Poisson, 1991). La alternancia de los sistemas de elongación y desaturación es necesaria para mantener un grupo metileno entre los dobles enlaces (Brenner, 1977). De este modo, se sintetizan en el organismo las familias de ácidos grasos poliinsaturados: serie n-6, serie n-3, serie n-9 y serie n-7 (Figura 4).

La deficiencia de ácidos grasos esenciales comporta efectos graves que pueden conducir a la muerte. Estos efectos son revertidos más fácilmente por la administración de ácidos grasos de la serie n-6 que por los de la serie n-3, de modo que son los primeros los que parecen ser los verdaderos ácidos grasos esenciales. No obstante, los ácidos grasos de la serie n-3 tienen mucha importancia en el desarrollo y funcionamiento de la retina y del cerebro (Neuringer y col., 1988), y su deficiencia provoca alteraciones neurológicas (Mead y col., 1986 b).

SINTESIS DE ACIDOS GRASOS

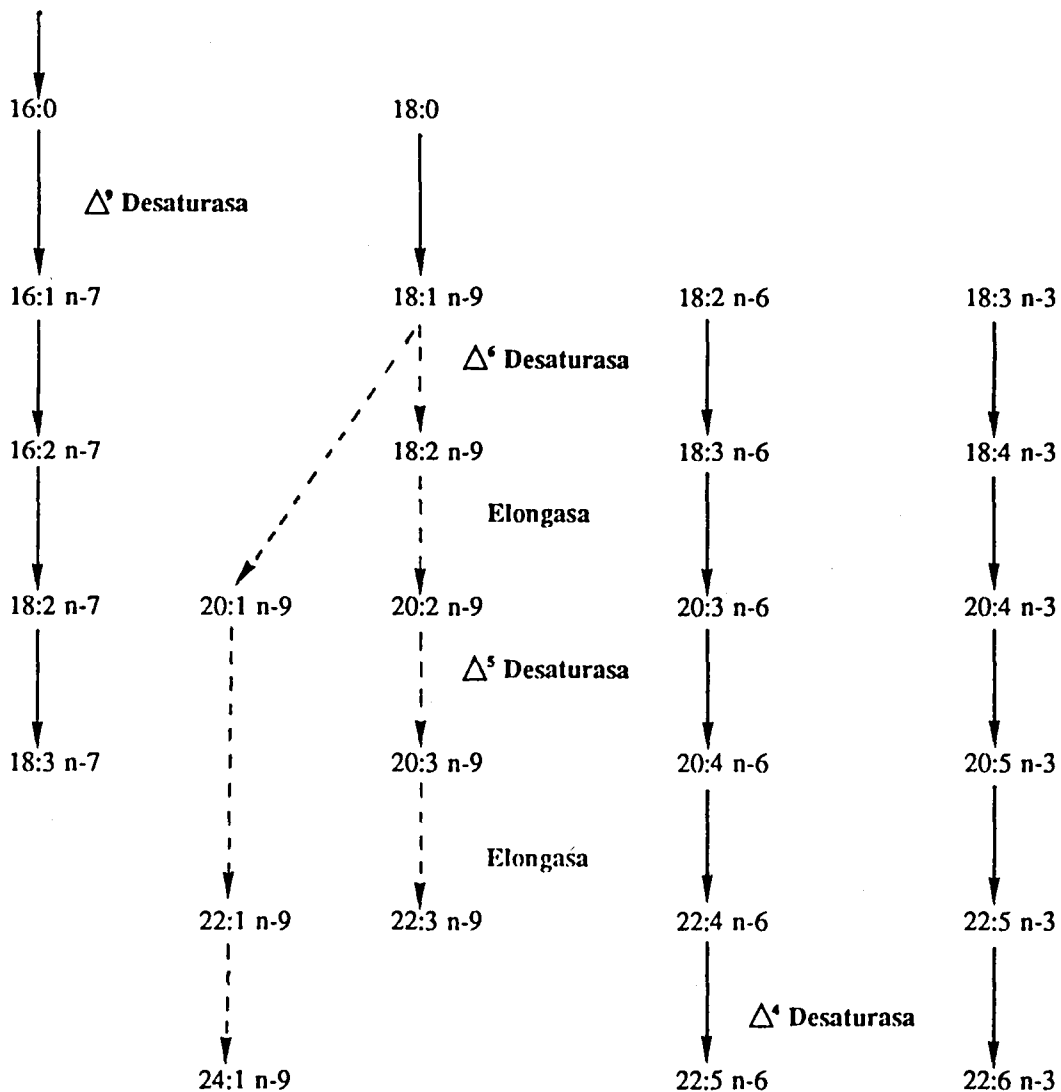


FIGURA 4. Representación de las vías del metabolismo de los ácidos grasos de las series n-7, n-9, n-6 y n-3.

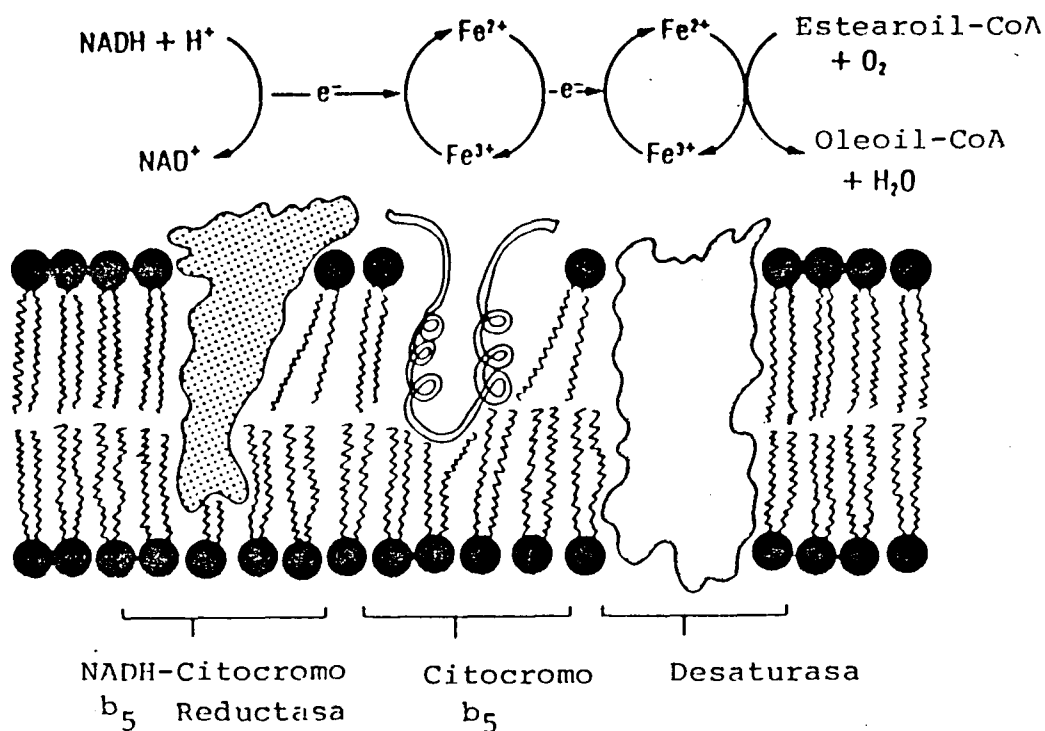
## Delta-9 desaturasa

Las delta-9 desaturasa es un sistema enzimático que está constituido por tres proteínas (Figura 5):

- NADH citocromo  $b_5$  reductasa
- citocromo  $b_5$
- desaturasa terminal o factor sensible al cianuro (CSF)

Cuando el cofactor reductor es el NADPH, interviene la NADPH citocromo P450, pero el propio citocromo P450 no está implicado (Oshino y col., 1966).

La asociación funcional de estos tres componentes a la membrana del retículo endoplasmático ha hecho muy difícil su purificación, y, aunque se ha conseguido purificar, para reconstituir la actividad deben estar presentes los tres componentes, además de una fracción lipídica que contenga fosfatidilcolina, como por ejemplo la lecitina de huevo (Strittmatter y col., 1974). La función de los fosfolípidos sería orientar la reductasa y la desaturasa para que interactuaran correctamente (Jeffcoat, 1979).



**FIGURA 5. Representación del complejo delta-9 desaturasa.**

La desaturasa terminal, que es el paso limitante de la reacción (Brenner, 1990), es altamente sensible al cianuro, pero no al CO, y, aunque posee un átomo de hierro por molécula, no es un hemoproteína (Oshino y col., 1966).

Como mínimo se han identificado dos genes que codifican la delta-9 desaturasa o estearoil-CoA desaturasa, llamados SCD-1 y SCD-2. El hígado expresa solamente la primera, mientras que tejido adiposo, riñón y pulmones expresan las dos formas (Tebbey y Buttke, 1992).

La delta-9 desaturasa no requiere obligatoriamente la presencia de proteínas citosólicas para expresar su actividad máxima (Jeffcoat, 1979). Su

substrato preferido es el estearoil-CoA, y no el palmitoil-CoA, pues éste es preferentemente elongado antes de su desaturación. La formación de ácidos grasos monoinsaturados por acción de esta desaturasa conduciría a la disminución del punto de fusión de los triglicéridos, facilitando la incorporación de éstos a las VLDL (Jeffcoat, 1979).

### Delta-5 y delta-6 desaturasas

Las características de la delta-6 y delta-5 desaturasas parecen ser muy similares a las de la delta-9 desaturasa, aunque solamente la primera ha podido ser purificada (Okayasu y col., 1981). Al igual que la delta-9, estos sistemas requieren oxígeno molecular, NAD(P)H y un sistema de transferencia de electrones. Ambas desaturasas necesitan la presencia de proteínas citosólicas para que su actividad sea máxima; así, tras el lavado de la fracción microsomal, la actividad de estas desaturasas se reduce drásticamente, pero puede ser restaurada por adición de proteína citosólica (Leikin y Brenner, 1986, 1989). La función de estas proteínas citosólicas no se conoce todavía, pero al menos parte de la activación que producen podría ser debida a su capacidad de unirse a los ácidos grasos, regulando así la disponibilidad de sustrato para la reacción o la eliminación de productos (Brenner, 1977; Cook, 1985).

La delta-6 desaturasa es el enzima velocidad limitante en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (Jeffcoat, 1979). Aunque tanto los ácidos grasos de la serie n-3 como los de la serie n-6 son metabolizados por la misma delta-6 desaturasa, existe mayor afinidad por la primera familia (Christiansen y col., 1991).

La delta-5 desaturasa representa un segundo paso, después de la delta-6, en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados y en la biotransformación de los ácidos grasos esenciales ingeridos en la dieta (Leikin y Brenner, 1992).

## **4.2. Regulación de los sistemas de desaturación**

Aunque parece existir un acoplamiento sincrónico de las reacciones de desaturación y elongación microsomales, su regulación parece estar controlada de forma diferente (Cinti y col., 1992)

### **4.2.1. Regulación por la dieta**

Las modificaciones en la dieta afectan enormemente la actividad delta-9 desaturasa. Así, cuando las ratas son sometidas a ayuno durante 12-72 horas, esta actividad enzimática disminuye hasta un 5 % de los valores control. Al realimentar los animales, la actividad desaturasa aumenta a niveles de 2 a 4 veces superiores a los valores normales. A este fenómeno se le ha llamado "superinducción", ya que cuando las ratas se realimentan con una dieta rica en hidratos de carbono o proteínas y libre en grasas, los niveles de actividad enzimática pueden aumentar más de 50 veces por encima del valor que presentan en estado de ayuno (Jeffcoat, 1979). Bajo estas condiciones, ni la actividad NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa ni el contenido en citocromo b<sub>5</sub> resultan modificados, de modo que la superinducción se debe a cambios en la actividad de la desaturasa terminal, y no en el flujo de electrones (Kawashima y Kozuka, 1982).

Cuando los animales son alimentados con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, la actividad delta-9 desaturasa se inhibe (Rosenthal y col., 1983; Garg y col., 1988). Parece ser que los ácidos grasos poliinsaturados actúan a nivel del gen de la delta-9 desaturasa, inhibiendo su expresión (Tebbey y Buttke, 1992). Por otra parte, la ingestión de aceites de fritura térmicamente oxidados produce una activación de la delta-9 desaturasa (Ruiz-Gutiérrez y Muriana, 1992).

Una dieta baja en proteínas, aunque sea rica en hidratos de carbono, produce una disminución de la actividad delta-9 desaturasa, la cual se

recupera, de hasta un 66 % por encima de los valores control con sólo 2 días de realimentación con una dieta equilibrada (Narce y col., 1992). El efecto de las restricciones proteicas sobre las desaturasas sólo tiene lugar en ratas en crecimiento o durante el embarazo, pero no en animales adultos (Narce y col., 1992)

A diferencia de la delta-9 desaturasa, las delta-5 y delta-6 desaturasas están poco afectadas por modificaciones en la dieta. Esta similitud de respuestas de la delta-5 y delta-6, claramente diferenciadas, y a veces incluso opuestas, a las de la delta-9, se observan no sólo respecto a las manipulaciones dietéticas, sino también, como se comentará en el siguiente punto, a las endocrinas (Brenner, 1990).

La delta-6 desaturasa es la que menos influenciada está por la dieta (los valores no varían más de un 25 %), puesto que responde a los requerimientos secundarios de la célula. Algunos autores (Christiansen y col., 1991) han observado ligeras diferencias en la respuesta de la delta-6 desaturasa a las modificaciones en la dieta según se utilizaran substratos de la serie n-3 o de la serie n-6. Aunque su actividad disminuye en animales sometidos a ayuno y la realimentación restaura los niveles normales de actividad enzimática, no se produce el fenómeno de la superinducción (Jeffcoat, 1979). La restricción proteica provoca una disminución de la actividad delta-6 desaturasa, que vuelve a recuperarse al cabo de 25 días de ingerir este tipo de dieta, debido a una respuesta adaptativa del organismo (Ulmann y col., 1992).

La actividad delta-5 desaturasa se incrementa poco por dietas ricas en hidratos de carbono, pero aumenta de forma considerable con dietas ricas en grasas, sobre todo oleico (Jeffcoat, 1979). La ingesta de aceites térmicamente oxidados provoca la inhibición de esta actividad (y también de la delta-6), de forma opuesta a su efecto sobre la delta-9 desaturasa (Ruiz-Gutiérrez y

Muriana, 1992). Al igual que la delta-6, la actividad delta-5 desaturasa disminuye en dietas bajas en proteína, pero en este caso la respuesta adaptativa del organismo es menor, pues los niveles sólo se recuperan hasta un 70 % de la actividad control (Ulmann y col., 1990).

#### **4.2.2. Regulación hormonal**

En general podríamos decir que la única hormona capaz de incrementar la actividad delta-5 y delta-6 es la insulina. El resto (glucagón, adrenalina, glucocorticoides, aldosterona, testosterona etc.) provocan una disminución de la actividad de estos sistemas enzimáticos, aunque el mecanismo de inhibición es distinto según la hormona. Así, testosterona y aldosterona desactivan directamente la desaturasa, los glucocorticoides actúan por un mecanismo genómico, y la adrenalina actuaría a través del incremento en los niveles de AMPc (Brenner, 1990).

El efecto de las hormonas sobre la delta-9 desaturasa es diferente a las otras dos desaturasas. Por ejemplo, la testosterona aumenta la actividad delta-9, y los glucocorticoides no la modifican (Brenner, 1990) o bien la incrementan (Marra y col., 1986; Marra y col., 1988). La hormona tiroidea disminuye la actividad delta-5, pero incrementa la delta-9 desaturasa (Hoch y col., 1980). La hiperglicemia provoca una disminución mucho mayor de la actividad delta-9 que de la delta-5 o delta-6 desaturasas. La insulina, en cambio, activa las tres desaturasas de igual manera, por un mecanismo de inducción genética (Mimouni y Poisson, 1992) que implica la síntesis de nueva proteína (Chanussot y col., 1989).

#### **4.2.3. Ritmo circadiano**

La desaturación de ácidos grasos, al igual que otros procesos relacionados con el metabolismo lipídico, como la síntesis de colesterol o la lipogénesis, sufre cambios a lo largo del día. Estos ritmos circadianos se



encuentran relacionados con la ingestión de alimentos, y se deben a variaciones en la síntesis de proteína enzimática. Así, la máxima actividad de la delta-9 desaturasa en rata se produce cerca de medianoche, momento que coincide con la máxima ingesta de alimento. La delta-6 desaturasa presenta dos picos de actividad, uno a las 4 h y otro, que coincide con el mínimo de actividad de la delta-9, a las 16 h. (Actis Dato y col., 1972). La existencia de estos ritmos circadianos refuerza la necesidad, cuando se realizan estudios comparativos, de sacrificar los animales a una misma hora para obviar las posibles variaciones en las actividades enzimáticas (Biagi y col., 1991; Ruiz-Gutiérrez y Muriana, 1992).

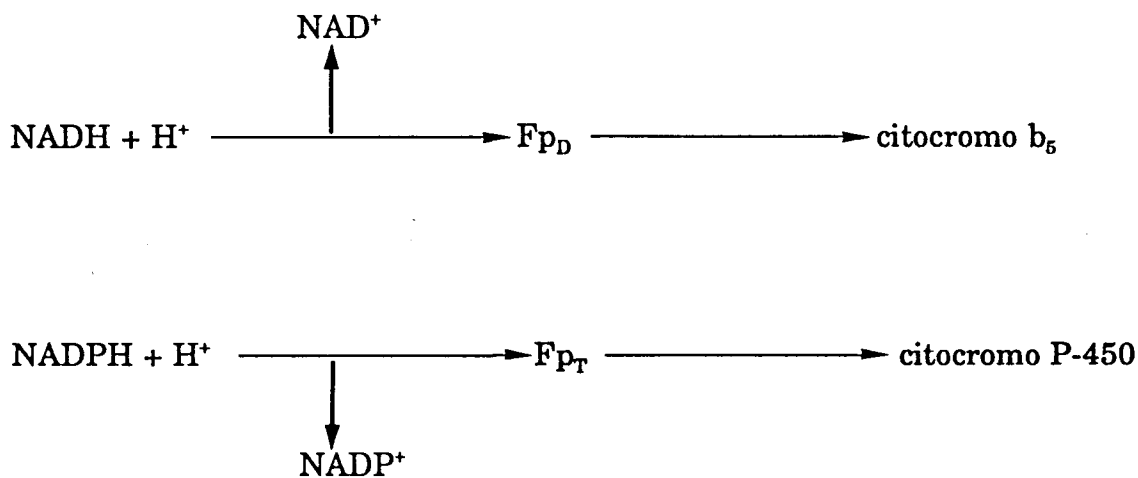
## **5. CADENAS DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL**

Como ya se ha apuntado, los electrones necesarios para las etapas reductivas de la elongación y de la desaturación se vehiculizan a través de las llamadas cadenas de transporte electrónico, de las cuales el retículo endoplasmático de los hepatocitos posee al menos dos (Nagi y col., 1983 b):

- El sistema NADH citocromo c reductasa, que está constituido por el citocromo  $b_5$  y su flavoproteína, llamada NADH citocromo  $b_5$  reductasa. Los electrones procedentes del citocromo  $b_5$  pueden también transferirse al citocromo P450, de modo que esta reductasa no sólo interviene en el metabolismo lipídico sino también en el de algunos fármacos.

- El segundo sistema utiliza NADPH, y los electrones fluyen a través de la NADPH citocromo c reductasa (también llamada NADPH citocromo P450 reductasa) hacia el citocromo P450 o hacia el citocromo  $b_5$ .

En la figura 6 se representan estas vías junto con los aceptores artificiales que se utilizan en la valoración de la actividad enzimática: citocromo c y ferricianuro.



**FIGURA 6. Cadenas de transporte electrónico microsomal.**

El citocromo  $b_5$  es una molécula anfipática de peso molecular 16700 D, estrechamente unida a la membrana del retículo endoplasmático. Presenta un dominio hidrofílico, que contiene un grupo hemo y que está relacionado con la función catalítica, y una región hidrofóbica de la que depende fundamentalmente la unión a la membrana microsomal. Esta región unida a la membrana microsomal no se requiere para la transferencia electrónica desde la NADH citocromo  $b_5$  reductasa, pero propicia la orientación adecuada

para la interacción catalítica.

La participación del citocromo  $b_5$  en la elongación microsomal de ácidos grasos fué sugerida por primera vez por Keyes y col. (1979), y posteriormente se estableció que únicamente intervenía en la primera etapa reductiva de la elongación, catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-CoA reductasa (Nagi y col., 1983). Otros autores (Demirkapi y col., 1990) sostienen, en cambio, la no participación del citocromo  $b_5$  en el proceso de elongación microsomal.

El citocromo  $b_5$  interviene en numerosas funciones metabólicas, además de la elongación y la desaturación de ácidos grasos, como son la biosíntesis de plasmalógenos, reducción de N-hidroxilaminas o la reducción de la metahemoglobina en los eritrocitos. Esta versatilidad viene conferida por el hecho de que el citocromo puede recibir electrones de dos reductasas distintas, la NADH citocromo  $b_5$  reductasa y la NADPH citocromo P450 reductasa. Además, el hecho de que la misma superficie del citocromo  $b_5$  pueda interaccionar a la vez con tantas enzimas da soporte a la idea de que estas proteínas se encuentran distribuidas al azar en la bicapa fosfolipídica y que las interacciones entre ellas dependen de la difusión rotacional y translacional (Dailey y Strittmatter, 1980).

La NADH citocromo  $b_5$  reductasa contiene FAD como grupo prostético, y está también fuertemente unida a la membrana microsomal. La interacción entre el citocromo  $b_5$  y la NADH citocromo  $b_5$  reductasa se lleva a cabo gracias a la complementariedad de cargas establecida entre los grupos lisil de la reductasa y los grupos carboxil que se encuentran rodeando al hemo del citocromo (Dailey y Strittmatter, 1980).

La NADPH citocromo P450 reductasa contiene cuatro dominios: 1) dominio de unión a la membrana, 2) dominio de unión al FMN, 3) dominio de unión al FAD y 4) dominio de unión al NADPH. Parece ser que el segundo dominio es el centro activo para la interacción con los citocromos aceptores de

electrones (Nisimoto y Ostuka-Murakami, 1988). Dado que esta reductasa puede interaccionar tanto con el citocromo c como con el citocromo  $b_5$ , se ha propuesto que en realidad deberían existir dos dominios para interaccionar con las cargas positivas o negativas que rodean respectivamente los grupos hemo de cada citocromo.

La NADPH citocromo P450 puede también transferir electrones hacia el citocromo P450 en diversas reacciones metabólicas, pero en el caso de la elongación los electrones son vehiculizados desde la reductasa sin que intervenga el citocromo (Ilan y col., 1981). Al igual que la NADH citocromo  $b_5$  reductasa, parece ser que la NADPH citocromo P450 reductasa participa solamente en la primera etapa reductiva de la elongación, y no en la segunda (Nagi y col., 1983).

## II. CATABOLISMO DE ACIDOS GRASOS

Las grasas constituyen importantes depósitos de energía metabólica para los seres vivos. La mayoría de lípidos ingeridos en la dieta lo son en forma de triglicéridos, y, en menor grado, como fosfolípidos y ésteres de colesterol. Para poder utilizarlos, es necesaria su hidrólisis para dar ácidos grasos libres.

La utilización de los ácidos grasos que han llegado al citosol celular requiere su conversión en acil-CoAs, por lo que deben transportarse hacia los orgánulos membranosos donde se sitúan las acil-CoA sintetasas. Este transporte se realiza a través de la unión de los ácidos grasos a unas proteínas llamadas proteínas transportadoras de ácidos grasos ("fatty acid binding proteins", FABP). Las de localización citosólica, que fueron las primeras en ser identificadas, se denominan FABP<sub>C</sub> para diferenciarlas de las localizadas en la membrana plasmática, llamadas FABP<sub>PM</sub>. Las citosólicas pueden existir en diferentes isoformas en el hígado, donde son bastante abundantes - entre un 2 y un 5 % de las proteínas citosólicas (Kaikaus y col., 1993) -, pero también se encuentran en cantidades apreciables en otros tejidos, sobre todo en el tejido adiposo. La FABP<sub>PM</sub> no está relacionada con la citosólica ni estructural ni inmunoquímicamente (Glatz y Van der Vusse, 1990). Las FABP se encargan de estimular el transporte y de dirigir los ácidos grasos a los diferentes orgánulos celulares, así como de proteger enzimas y membranas celulares del ataque de éstos (Sweetser, 1987). Recientemente se ha podido demostrar que las FABP no están implicadas en la translocación de acil-CoAs a través de la membrana peroxisómica (Reubsaet y col., 1990).

También se ha identificado una proteína citosólica, llamada proteína transportadora de acil-CoAs (acil-CoA binding protein, ACBP), que a diferencia de la anterior, sólo es capaz de unirse a acil-CoAs de mediana y larga cadena pero no a ácidos grasos libres (Rasmussen, 1990). La ACBP no

presenta homología con las FABP y no tiene isoformas distintas (Glatz y Van der Vusse, 1990). La concentración de ACBP en hígado es mucho menor que la de FABP, por ello debe tener una afinidad muy superior a ésta para unirse a los acil-CoAs (Knudsen, 1991). Es curioso que la ACBP presenta una composición aminoacídica idéntica a la proteína de inhibición de la unión del diazepam, o "diazepam binding inhibitor" (DBI). Las implicaciones fisiológicas de este hecho no están claras, pero parece poco probable que esta proteína pueda constituir el neurotransmisor endógeno que se uniese al sitio del diazepam en el GABA (Knudsen, 1990).

El destino de los acil-CoA ésteres depende del tipo de células a las que se han incorporado. Así, en los miocitos se destinan principalmente a su oxidación para obtener energía. En adipocitos y hepatocitos, su utilización para el catabolismo o para la síntesis dependerá del estado nutricional del animal.

## **β-OXIDACION**

En 1904 Franz Knoop dedujo que los ácidos grasos se degradan por un proceso de oxidación del carbono β de la cadena, llamado por ello β-oxidación. Esta tiene lugar en mitocondrias y en peroxisomas, aunque en condiciones normales es el sistema mitocondrial el más activo, representando el 85-90 % del total (Brady y col., 1989). En la Figura 7 se muestran, de forma comparativa, las vías de β-oxidación peroxisómica y mitocondrial.

Una de las características de la β-oxidación mitocondrial es que se realiza en el interior de la matriz de éste orgánulo, y que, por tanto, los acil-CoAs deben ser transferidos a ella desde la membrana externa. Para realizar este transporte es necesario su unión a la carnitina. La llamada carnitinaciltransferasa I, presente en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial, cataliza la transferencia del grupo acilo desde el SH del coenzima A al OH de la carnitina. Actúa entonces la carnitinaciltranslocasa,

que transporta el complejo a través de la membrana interna. En la superficie interna de ésta se localiza la carnitínaciltransferasa II, que cataliza la transferencia del grupo acil a una nueva molécula de coenzima A.

Una vez en la matriz mitocondrial, el acil-CoA sufre un proceso de degradación que tiene lugar en cuatro etapas catalizadas por los siguientes enzimas :

#### 1. Acil-CoA deshidrogenasa

Cataliza la deshidrogenación del enlace entre los carbonos alfa y beta, obteniéndose como producto de la reacción un trans-2-enoil-CoA, y generándose  $FADH_2$ .

#### 2. Enoil-CoA hidratasa

En esta etapa se adiciona una molécula de agua al doble enlace formado en la fase anterior. La reacción es estereoespecífica, pues solamente se forma el L-isómero del 3-hidroxiacil-CoA.

#### 3. L-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa

Esta es la segunda etapa oxidativa del proceso, en la cual el grupo hidroxil se convierte en ceto, generándose NADH.

#### 4. 3-cetoacil-CoA tiolasa

El enlace entre el 3-cetoacil y el CoA se rompe por acción de una nueva molécula de CoA, obteniéndose acetil-CoA y el acil-CoA inicial acortado en dos átomos de carbono. Este experimenta entonces un nuevo ciclo de oxidación hasta que todos sus átomos de carbono han sido transformados en acetil-CoA.

## **$\beta$ -oxidación peroxisómica**

La  $\beta$ -oxidación peroxisómica es específica de ácidos grasos de cadena larga, entre 8 y 22 átomos de carbono (Lazarow y De Duve, 1976). Además, presenta preferencia por los ácidos grasos de cadena más poliinsaturada o ramificada, así como por los ácidos dicarboxílicos (van den Bosch y col., 1992). La importancia de este proceso se refleja en el hecho de que su impedimento causa enfermedades de extrema gravedad, como se comenta en el capítulo correspondiente a los peroxisomas. Por ejemplo, en los enfermos de adrenoleucodistrofia, la  $\beta$ -oxidación peroxisómica de ácidos grasos de muy larga cadena, particularmente de ácido hexacosanoico (C 26:0) está impedida.

Singh y Poulos (1988) propusieron que la acil-CoA sintetasa de la membrana peroxisómica estaría acoplada al sistema de  $\beta$ -oxidación, pues sería la encargada de sintetizar el derivado CoA del ácido graso para que éste pudiera ser oxidado. También existen evidencias sobre la existencia de una segunda acil-CoA sintetasa peroxisómica, con especificidad para ácidos grasos de muy larga cadena (van den Bosch y col., 1992).

La  $\beta$ -oxidación tiene lugar en la matriz del peroxisoma, pero los acetil-CoAs pueden ser transferidos de manera directa, sin necesidad de la intervención de la carnitina. Las carnitinaciltransferasa peroxisómicas estarían implicadas en el transporte de los productos de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica hacia las mitocondrias (van den Bosch y col., 1992).

El primer enzima que actúa en la secuencia de reacciones de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica es una acil-CoA oxidasa, que da lugar a un derivado trans-2-enoil-CoA. La acil-CoA oxidasa contiene FAD, y la reducción del FADH<sub>2</sub> tiene lugar por interacción directa con el oxígeno molecular, rindiendo



$H_2O_2$  (van den Bosch y col., 1992). La producción de  $H_2O_2$ , el cual es eliminado por acción de otro enzima peroxisómico, la catalasa, es una de las características diferenciales de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica respecto de la mitocondrial. Esta es la reacción velocidad limitante del proceso. Recientemente se han aportado evidencias acerca de la existencia de dos acil-CoA oxidasas en peroxisomas hepáticos de rata, una de ellas inducible por clofibrato y la otra no (van den Bosch y col., 1992).

Las siguientes reacciones están catalizadas por una proteína bifuncional que engloba las actividades enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. En realidad se trata de una proteína trifuncional, dado que también presenta actividad delta<sup>3</sup>-cis-delta<sup>2</sup>-trans-enoil-CoA isomerasa (van den Bosch y col., 1992).

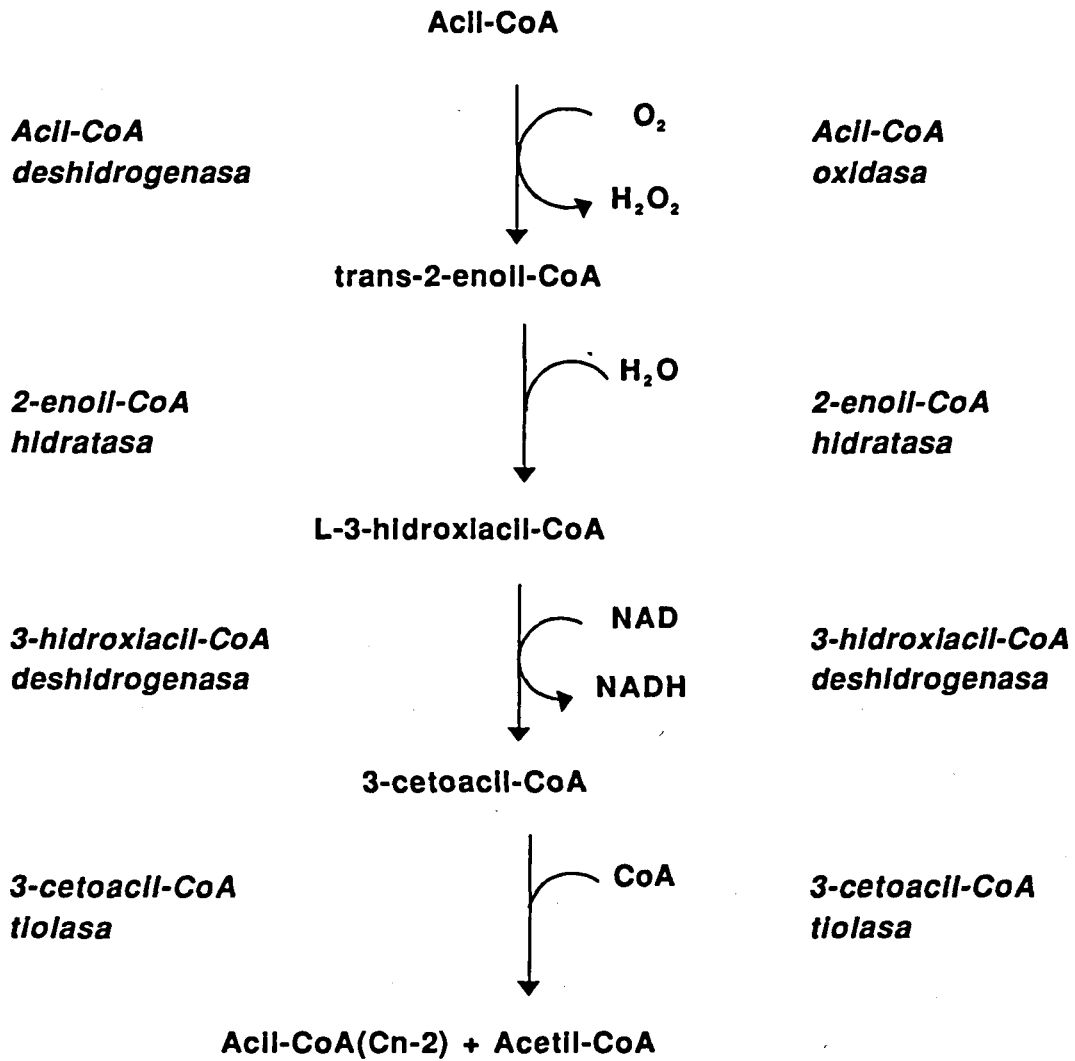
La última etapa está catalizada, al igual que en el proceso mitocondrial, por la 3-cetoacil-CoA tiolasa. En peroxisomas de hígado de rata se han detectado dos tiolasas diferentes respecto a su peso molecular e inducibilidad por clofibrato. Estas dos tiolasas están codificadas por genes diferentes pero que presentan un alto grado de homología (van den Bosch y col., 1992).

Una de las funciones fisiológicas de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica es metabolizar los ácidos grasos de muy larga cadena, dando lugar a metabolitos más cortos y más polares, los cuales pueden seguir  $\beta$ -oxidándose en la mitocondria; asimismo, la  $\beta$ -oxidación peroxisómica también metaboliza más fácilmente ácidos grasos poliinsaturados que la mitocondria (Hiltunen, 1991). Sin embargo, el sistema de  $\beta$ -oxidación de los peroxisomas no solo tiene importancia en la degradación de ácidos grasos, sino que también tiene funciones anabólicas: el acetil-CoA formado por esta vía se utiliza preferencialmente para la biosíntesis de ácidos biliares, ácidos grasos y fosfolípidos, y no para la biosíntesis de colesterol o triglicéridos (Hayashi y

Takahata, 1991).

**MITOCONDRIA**

**PEROXISOMA**



E.B. : Enzima Bifuncional

**FIGURA 7. β-oxidación mitocondrial y peroxisómica**

La  $\beta$ -oxidación peroxisómica representa un % bastante bajo de la actividad de  $\beta$ -oxidación total en el hígado en condiciones normales (Brady y col., 1989). Sin embargo, en ratas tratadas con proliferadores peroxisómicos, la actividad de este sistema enzimático se incrementa hasta 40 veces (Hardeman, 1990), adquiriendo mucha más importancia. Las implicaciones de este fenómeno se discuten en el capítulo siguiente.

### **III. PROLIFERACION PEROXISOMICA**

#### **1. PEROXISOMAS**

Los peroxisomas fueron descritos por primera vez en el citoplasma de células de ratón por Rodin en 1954, y purificados en 1966 por el equipo de C. de Duve. Son orgánulos rodeados por una membrana única, ubicuos en las células de mamífero a excepción de los eritrocitos maduros. Son muy abundantes en tejidos activos en el metabolismo lipídico, como el hígado (van den Bosch y col., 1992). Su apariencia morfológica y su número varían enormemente dependiendo del tipo de célula. En el hígado suelen ser bastante grandes (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) y su forma es redondeada u oval (Hardeman, 1990). El orgánulo presenta estructura interna reticular, y en la matriz se encuentra el cuerpo cristalino, que contiene la urato oxidasa en la rata (Latruffe, 1992). En las primeras fases de la proliferación de los peroxisomas se observa la existencia de interconexiones entre ellos. Este retículo peroxisómico es una forma temporal, que solo está presente en los momentos de crecimiento rápido de este orgánulo (Fahimi y col., 1993). Actualmente se considera que los peroxisomas no se forman a partir del retículo endoplasmático, sino por la importación de proteínas en los peroxisomas ya existentes y la posterior fisión de los mismos (van den Bosch y col., 1992).

Los peroxisomas han ocupado en los últimos años un lugar importante en la biología celular por cuatro razones: sus funciones metabólicas, el fenómeno de la proliferación, la relación entre ésta y la carcinogénesis y la existencia de enfermedades genéticas peroxisómicas.

Las funciones de los peroxisomas son menos obvias que las de otros orgánulos celulares, principalmente porque su maquinaria enzimática difiere enormemente entre distintas especies y incluso entre distintos órganos. La matriz peroxisómica contiene más de 40 enzimas (Valle y Gärtner, 1993) que

catalizan diversas funciones metabólicas, entre ellas:

- catabolismo de  $H_2O_2$  por el enzima catalasa
- $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de muy larga cadena, de ácidos dicarboxílicos y de prostaglandinas
- catabolismo oxidativo de poliaminas, de derivados de colesterol, de bases púricas
- biosíntesis de plasmalógenos: las tres fases iniciales de la síntesis de éstos, están catalizadas por enzimas de localización exclusivamente peroxisómica (Cook y col., 1991)
- biosíntesis de fosfolípidos
- biosíntesis de colesterol: etapa inicial, consistente en la condensación de unidades de acetil-CoA en acetoacetil-CoA; además los peroxisomas contienen hidroximetilglutaril-CoA reductasa (Thompson y Krisans, 1990).

La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de muy larga cadena es actualmente objeto de atenciones particulares debido a la inducibilidad de sus enzimas por los proliferadores peroxisómicos. Juntamente con los tres enzimas de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica se inducen también la acil-CoA sintetasa y la carnitino-octanoil transferasa, que asegura la salida al exterior del peroxisoma de los ácidos grasos cuya cadena ha sido acortada (Latruffe, 1992).

## **2. DESORDENES PEROXISOMICOS**

El interés en el estudio de los peroxisomas se ha visto reforzado por el descubrimiento, en 1982, de la existencia en humanos de enfermedades debidas a desórdenes peroxisómicos, las cuales pueden dividirse en tres grupos (Haredman, 1990):

### **a) Pérdida general de funciones peroxisómicas.**

El número de peroxisomas está muy reducido y su estructura es anormal; los enzimas de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica no están presentes, pues aunque se sintetizan, son rápidamente degradados (Moser, 1991). En este

grupo se incluyen:

- síndrome de Zellweger
- adrenoleucodistrofia neonatal
- enfermedad de Refsum infantil
- acidemia hiperpipecólica

b) Pérdida de múltiples funciones peroxisómicas:

- condrodisplasia punctata rizomélica: debida a déficit en los enzimas dihidroxicetona fosfato (DHAP) aciltransferasa, alquil-DHAP sintasa y oxidasa del ácido fitánico.

- deficiencia combinada de  $\beta$ -oxidación peroxisómica (Síndrome tipo Zellweger).

c) Pérdida de una única función peroxisómica:

- adrenoleucodistrofia (defecto en la acil-CoA sintetasa peroxisómica de muy larga cadena)

- deficiencia en la acil-CoA oxidasa

- enfermedad de Refsum clásica (déficit en la acido fitánico oxidasa)

- hiperoxaluria tipo I (déficit en la alanin:glioxilato aminotransferasa)

- acatalasemia (déficit en la catalasa)

Estas enfermedades genéticas frecuentemente tienen consecuencias clínicas muy serias; por ejemplo, el síndrome de Zellweger es una rara enfermedad autosómica recesiva caracterizada por profunda neuropatía y disfunción hepática y renal, que produce la muerte en las primeras semanas o meses después del nacimiento (Hardeman, 1990).

Gracias a la microscopía electrónica se ha evidenciado la ausencia de peroxisomas intactos en hígado y riñón de niños con el síndrome de Zellweger y enfermedad de Refsum infantil, así como la existencia de peroxisomas muy

pequeños en la adrenoleucodistrofia neonatal (Roels y col., 1993). Sin embargo, en cultivos de fibroblastos de pacientes de Zellweger, se ha detectado la presencia de vesículas vacías, bordeadas por proteínas de matriz peroxisómica, llamadas "fantasmas" peroxisómicos. Estas estructuras son de 2 a 4 veces mayores que los peroxisomas normales, y les falta la mayoría de su contenido, resultando en una densidad mucho menor (Hardeman, 1990). Estos hallazgos están en concordancia con la hipótesis de que el defecto primario en el caso de un impedimento general de la función peroxisómica radica en la maquinaria de importación para las proteínas de matriz.

### 3. PROLIFERACION

Una de las particularidades de la biología de los peroxisomas es que son orgánulos inducibles. Las características típicas del fenómeno de inducción peroxisómica son: (Hawkins y col, 1987):

- Existencia de una relación dosis-intensidad de la inducción, y una gradación de potencia entre los diversos inductores peroxisómicos.

- Gran selectividad de especie: la proliferación es muy fuerte en roedores como rata y ratón, moderada en hámster y débil o nula en cobaya, perro, gato, mono y hombre. Así, se ha descrito que los cultivos de hepatocitos de conejo, cobaya y mono son al menos 30 veces menos sensibles que los de rata a los proliferadores peroxisómicos (Driven y col., 1993). También hay especificidad de tejido; por ejemplo, en comparación con el incremento de unas 20 veces en los niveles de RNAm para los enzimas de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica en hígado de rata, los incrementos en riñón, intestino delgado y corazón son mucho menores (entre 2 y 4 veces), mientras que en los restantes tejidos no se observa variación (van den Bosch y col., 1992). Por otro lado, los enzimas peroxisómicos responden de manera distinta a la proliferación: así, mientras que la  $\beta$ -oxidación está muy estimulada (entre 7 y 40 veces), la catalasa sólo llega a duplicar su actividad (Hardeman, 1990).

- Se produce la inducción de un grupo de isoenzimas del citocromo P-450, conjuntamente con la proliferación del retículo endoplasmático. Estos isoenzimas inducidos se denominan citocromo P450 IV, y catalizan la w-hidroxilación de ácidos grasos, especialmente de ácido láurico.

- Aparición de hepatomegalia debida a fenómenos de hiperplasia y hipertrofia.

- Acción carcinogénica hepática a largo plazo.

### **3.1. Estructura de los agentes proliferadores peroxisómicos**

Una gran variedad de moléculas de naturaleza lipófila poseen la capacidad de provocar la proliferación de los peroxisomas. Por ejemplo los fármacos hipolipemiantes de la familia de los fibratos, cuyos análogos, incluyendo la nafenopina o el metil clofenapato, fueron los únicos proliferadores peroxisómicos conocidos hasta 1975 (Moody y col., 1992). En la actualidad, se conocen más de 100 compuestos que pueden actuar como proliferadores peroxisómicos: plastificantes como ftalatos (mono- y di-(2-etilhexil)ftalato) y adipatos, ampliamente utilizados en embalaje de productos alimentarios, herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético o el 2,4,5-triclorofenoxiacético, ácido acetilsalicílico y fármacos hipolipemiantes no pertenecientes a la familia de los fibratos, como el potente Wy-14,643 etc. También son proliferadores peroxisómicos algunas sustancias alimenticias como el ácido fítico, constituyente de la clorofila, los ácidos grasos poliinsaturados de aceites de pescado, y sustancias endógenas como las hormonas esteroideas (estradiol, dehidroepiandrosterona) y tiroideas, e incluso el ácido retinoico.

Frecuentemente, la característica estructural común de estos compuestos es la existencia de un anillo aromático, en general portador de una función carboxílica y de otros substituyentes, como por ejemplo halógenos.



Una lipofilia moderada, la presencia de un grupo carboxilo (o bien de un bioisómero del grupo carboxilo, Lewis y Blake, 1993) y de halógenos en la molécula se consideran los requerimientos estructurales para que un compuesto químico actúe como proliferador peroxisómico (McGuire y col., 1991). Las capacidades de BFB y CFB como inductores peroxisómicos son superiores a las de GFB, sugiriendo que la halogenación de la molécula puede incrementar su potencia (McGuire y col., 1992). Para otros autores, la única relación clara estructura actividad que ha emergido de los estudios sobre los requerimientos para actuar como proliferador peroxisómico es la función carboxílica, susceptible de regular el metabolismo de ácidos grasos (Bieri y Lhuguenot, 1993).

### **3.2. Hepatomegalia**

La proliferación de los peroxisomas está asociada con el incremento de tamaño del hígado, que resulta de una combinación de hipertrofia e hiperplasia celular. Estos fenómenos son observables en unos días, y alcanzan el máximo al cabo de una semana de tratamiento, siendo estables al menos durante 1-3 meses (Bieri y Lhuguenot, 1993). De forma paralela puede producirse un incremento de hasta el 25 % de la masa relativa del tejido renal (Latruffe, 1992).

La magnitud de la hepatomegalia, que es un fenómeno dependiente de la dosis y del compuesto proliferador, se correlaciona bien con los incrementos en el número y volumen de los peroxisomas, y, en menor grado, del retículo endoplasmático rugoso. (Moody y col., 1992).

La hipertrofia está caracterizada por un aumento de tamaño del hígado y de los hepatocitos, mayor contenido en agua, DNA, RNA y proteínas (Bieri y Lhuguenot, 1993). El incremento del tamaño del hígado está asociado a un crecimiento del número de células que sufren síntesis replicativa del DNA. Esta actividad mitogénica ocurre en ausencia de necrosis y se considera

replicativa más que reparativa. Muchos investigadores han mostrado que este incremento en la síntesis replicativa del DNA está precedido por la inducción de una serie de enzimas, como la proteinkinasa C y oncogenes (Bieri y Lhuguenot, 1993). La contribución de la hiperplasia a la hepatomegalia es variable, pues compuestos que causan un nivel similar de proliferación de peroxisomas pueden producir diversos grados de hiperplasia (Moody y col., 1992).

### **3.3. Inducción del citocromo P450IV**

Los isoenzimas del citocromo P450 constituyen un grupo de más de 150 genes clasificados en familias y subfamilias de acuerdo con sus similitudes en la secuencia aminoacídica correspondiente. Muchos de estos genes están regulados por xenobióticos, por ejemplo los proliferadores peroxisómicos son activadores transcripcionales de la familia P450 IV. Esta familia está constituida por al menos diez genes que están implicados sobre todo en el metabolismo de substratos lipídicos como ácidos grasos, prostaglandinas y leucotrienos. Estos genes están principalmente expresados en hígado, pulmón y riñón, y en menor grado en otros tejidos (Moody y col., 1992).

Los enzimas de esta familia catalizan la omega-hidroxiación de los ácidos grasos para dar lugar a ácidos dicarboxílicos. Exhiben una alta preferencia para la hidroxilación del grupo metil terminal (omega), por encima de los grupos metileno internos, que están termodinámicamente favorecidos. El llamado citocromo P450IVA1 corresponde a la omega-hidroxiación del ácido láurico de hígado de rata. Es el enzima mejor caracterizado de la familia, presenta un peso molecular de 58222 D, y constituye un 1-2 % del total de citocromo P450 del hígado de ratas en condiciones normales (Ortiz de Montellano y col., 1992).

El tratamiento con proliferadores peroxisómicos produce la inducción de este isoenzima por un proceso de activación transcripcional (Bell y col., 1992), de forma que llega a constituir un 16-30 % del total de citocromo P450

(Ortiz de Montellano y col., 1992). Esta inducción es distinta según la especie animal, siendo los roedores inferiores, ratas y ratones, los más susceptibles a ella, mientras que especies como la cobaya o el conejo son resistentes a este fenómeno (Moody y col., 1992). Por otro lado, se observa también una especificidad de sexo, pues la inducción es muy superior en ratas macho (Sundseth y Waxman, 1992).

La estrecha relación existente entre la inducción del citocromo P450IVA1 y la de la  $\beta$ -oxidación se revisa en el siguiente punto.

### **3.4. Teorías sobre el mecanismo de la inducción peroxisómica**

Dado que la proliferación peroxisómica puede observarse en cultivos primarios de hepatocitos, el factor o factores responsables de la iniciación de este fenómeno parece ser intrahepático (Lewis y Blake, 1993).

Una de las teorías propuestas es la de la alteración metabólica por sobrecarga de substrato (Ortiz de Montellano, 1992; Kaikaus y col., 1993; Lewis y Blake, 1993): Los proliferadores peroxisómicos alteran el metabolismo de los ácidos grasos, incrementando los niveles de éstos y, por su similitud estructural, desplazándolos de su unión a las FABPc. Posiblemente, las interacciones de los proliferadores peroxisómicos con las FABP estén implicadas en las perturbaciones del metabolismo de los ácidos grasos (Cannon y Eacho, 1991). La acumulación de ácidos grasos de cadena media como consecuencia de la perturbación del metabolismo lipídico resulta en la inducción del citocromo P450IVA1, encargado de la omega-hidroxilación de los ácidos grasos. Los ácidos dicarboxílicos de larga cadena obtenidos por esta vía sólo pueden oxidarse en los peroxisomas (Sharma y col., 1988), por lo que se produciría la inducción de estos orgánulos. La necesidad de sintetizar los constituyentes lipídicos para las nuevas membranas microsomales y peroxisómicas explicaría el incremento de otros enzimas celulares implicados en la síntesis lipídica.

Algunos autores descartan esta teoría, pues el tratamiento con ácidos dicarboxílicos no produce por sí mismo proliferación peroxisómica (Aarsland y Berge, 1991). En cambio, otros grupos han demostrado la inhibición de la proliferación peroxisómica en cultivos celulares por inhibición del citocromo P450IVA1, lo que parece indicar que la  $\omega$ -hidroxilación de los ácidos grasos constituye una señal para la proliferación peroxisómica (Ortiz de Montellano y col., 1992). Además, la inducción del citocromo P450IVA1 precede en el tiempo a la de la acil-CoA oxidasa (enzima velocidad limitante de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica). Esta diferencia temporal es independiente de la estructura o de la potencia del compuesto proliferador, lo que sugiere que la inducción del citocromo P450IVA1 es el fenómeno inicial del proceso de la proliferación peroxisómica (Bell y Elcombe, 1991; Chinje y Gordon Gibson, 1991; Kaikaus y col., 1993). La  $\omega$ -hidroxilación del ácido láurico aparece, pues, como el marcador de proliferación peroxisómica más sensible: la concentración del proliferador MEHP que causa un incremento del 50 % en la actividad de este enzima es mucho menor que la que causa un 50 % de incremento en la actividad palmitoil-CoA oxidasa (Driven y col., 1993).

La capacidad de los proliferadores peroxisómicos para modular la transcripción génica de forma rápida sugiere que estos compuestos pueden actuar por un mecanismo similar al de las hormonas, es decir, a través de un receptor citosólico que se dirigiría al núcleo de la célula para activar los genes correspondientes. La posible existencia de un receptor citosólico fue propuesta por primera vez por Lalwani y col. (1983), los cuales describieron una proteína hepática a la que se unía la nafenopina. Algunos autores descartaron esta teoría al no encontrar evidencia de la existencia del putativo receptor a través de estudios de "binding" (Milton y col., 1988). Posteriores estudios de Lalwani y col., (1987) y de Alvares y col., (1990), han identificado una proteína de unión a proliferadores peroxisómicos, de 72 kD, miembro de la familia de las llamadas "heat shock proteins" (HSP 70).

Recientemente, Issemann y Green (1990), han podido identificar una

proteína de 468 aminoácidos a la que han llamado "peroxisome proliferator activated receptor" (PPAR), que podría constituir el receptor propuesto. Sin embargo, la relación entre el PPAR y la proteína de 72 kD no ha sido establecida todavía (van den Bosch y col., 1992). El PPAR pertenece a la llamada "superfamilia" de receptores nucleares hormonales, debido al alto grado de homología que presenta con las secuencias de los genes de los receptores de la hormona tiroidea, la vitamina D y el ácido retinoico (Poellinger y col., 1992). Los diversos proliferadores peroxisómicos ensayados son capaces de activar el PPAR, pero no se ha podido demostrar la unión directa de éstos al receptor (Issemann y Green, 1990). Un estudio posterior (Tugwood y col., 1992) demostró que el gen de la acil-CoA oxidasa, marcador de proliferación peroxisómica, contiene una secuencia de reconocimiento al PPAR, llamada PPRE, de modo que la presencia del receptor es necesaria para mediar los efectos de los proliferadores peroxisómicos sobre esta enzima. Recientemente, se han presentado evidencias de que la activación del PPAR es enantioselectiva, pues en el caso del MK-571, ésta solo se evidencia con el estereoisómero S, que es el único capaz de ejercer la acción proliferadora peroxisómica (Boie y col., 1993).

Además de los estudios a nivel genético, se ha visto que el tratamiento de ratas con el potente proliferador fenofibrato provoca la inducción del nivel de RNAm del PPAR en el hígado de estos animales, mientras que el nivel de expresión constitutiva era muy bajo (Gebel y col., 1992).

La implicación de uno o más receptores citosólicos en el fenómeno de la inducción peroxisómica explicaría, por su presencia o ausencia, las diferencias observadas en cuanto a la respuesta a estos agentes en función del sexo, órgano o especie estudiada (Chinje y Gordon Gibson, 1991). A este respecto cabe señalar que se ha comprobado que los tejidos donde existe un alto nivel de expresión del gen PPAR son justamente los tejidos que responden a los proliferadores peroxisómicos (Issemann y Green, 1990).

Por otro lado, aunque se ha comprobado que el PPAR es activado por los proliferadores peroxisómicos, no se ha podido encontrar el ligando fisiológico de este receptor. Dado que las dietas ricas en grasa estimulan la  $\beta$ -oxidación, los ácidos grasos constituyen posibles candidatos para tal papel. Recientemente se ha comprobado que concentraciones fisiológicas de ácidos grasos, especialmente poliinsaturados, pueden activar el PPAR de *Xenopus laevis* con la misma potencia que el proliferador peroxisómico Wy 14, 643 (Keller y col., 1993). También se ha propuesto la posibilidad de que los ácidos grasos dicarboxílicos fuesen los ligandos del PPAR, estableciéndose así una conexión entre la teoría de la sobrecarga de substrato y la de la existencia de receptores citosólicos (Kaikaus y col., 1993). Sin embargo, no existe evidencia directa que soporte esta hipótesis.

### **3.5. Inducción peroxisómica y carcinogénesis**

La administración crónica de proliferadores peroxisómicos a ratas o ratones produce tumores hepáticos, aunque la incidencia de éstos depende del tipo de compuesto utilizado (Bieri y Lhuguenot, 1993). Según el estado actual de conocimientos, muchos trabajos están a favor de la idea de que el riesgo de cáncer hepático en el hombre tratado crónicamente con fibratos es escaso teniendo en cuenta la débil proliferación peroxisómica observada en primates, y las bajas dosis diarias utilizadas (Latruffe, 1992). Para que este argumento sea válido, debe comprobarse que la proliferación peroxisómica es la causa de la carcinogénesis. Algunos autores (Marsman y col., 1992) consideran que ni la hepatomegalia ni la proliferación peroxisómica son buenos indicadores de actividad carcinogénica. Eacho y col (1991) abogan por esta hipótesis, dado que el compuesto proliferador peroxisómico LY171883 es capaz de incrementar la incidencia de carcinomas hepatocelulares en ratones a dosis que no comportan inducción de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica.

De todos modos, aunque existiera esta dependencia, en cultivos de hepatocitos de procedencia humana no se ha evidenciado aumento en el

volumen de peroxisomas (van den Bosch y col., 1992). Sin embargo, parece existir cierta proliferación peroxisómica en humanos aunque ésta siempre va acompañada de disminución en el tamaño de estos orgánulos, a diferencia de lo que sucede en rata (Roels y col., 1993).

Los proliferadores peroxisómicos no son directamente genotóxicos, pues no se unen al DNA (Bieri y Lhuguenot, 1993). Los tests de carcinogénesis a corto plazo, donde se ensaya la capacidad de un compuesto para producir daños al DNA (test de mutagenicidad de Ames, por ejemplo) han resultado negativos para la mayoría de proliferadores peroxisómicos (Reddy y col., 1980).

Se han sugerido varias hipótesis sobre el mecanismo de hepatocarcinogénesis: movilización de calcio, activación de la cascada de oncogenes, efecto del PPAR activado sobre el estado de diferenciación, consecuencias a largo plazo del desequilibrio metabólico originado por el incremento de actividad de los enzimas peroxisómicos o estrés oxidativo producido por el exceso de  $H_2O_2$  (Bieri y Lhuguenot, 1993).

Una de las teorías más discutidas es la del estrés oxidativo (Moody y col., 1992): la superproducción de  $H_2O_2$  debido a la fuerte actividad de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica junto con la limitada degradación de ésta por la catalasa y la glutathion peroxidasa, la cual resulta inhibida, podría conducir a la alteración de las bases nucleotídicas. Se ha visto que cuando los peroxisomas se incuban en presencia de DNA, se produce ruptura de éste, proporcional a la cantidad de  $H_2O_2$  liberada (Moody y col., 1991). De hecho, si bien es cierto que tras la administración de hipolipemiantes se han encontrado algunas bases modificadas, como la 8-hidroxidesoxiguanina, éstas están en muy baja proporción, y probablemente son rápidamente eliminadas por los mecanismos naturales de reparación del ADN (Latruffe, 1992).

Una segunda posibilidad sería que los proliferadores peroxisómicos

actuaran como promotores de focos neoplásicos iniciados ya en el hígado de manera espontánea (Moody y col, 1991). En presencia de un agente iniciador, estos compuestos aceleran la formación del tumor, actuando pues como promotores de éste (Kraupp y col., 1989). En general, los proliferadores peroxisómicos son positivos como promotores en estudios a largo plazo, que culminan con la detección del tumor, pero no en tests a corto plazo. La promoción podría producirse por incremento de la replicación celular; a este respecto es interesante comentar que se ha observado incremento de la síntesis de DNA en hepatocitos de primates a dosis que no causan proliferación peroxisómica. En contra de esta hipótesis está el hecho de que ningún otro promotor "puro" es capaz de producir tumores con una incidencia del 100 %, como es el caso de algunos proliferadores peroxisómicos (Moody y col., 1991).

Por otro lado, los proliferadores peroxisómicos también pueden actuar modificando las vías de señalización que conducen a la regulación del ciclo celular; así, los proliferadores peroxisómicos son capaces de mimetizar la vía de señalización de los fosfolípidos por activación de la proteincinasa C (Latruffe, 1992). Así, los inhibidores de este enzima, como el H-7, son capaces de suprimir la inducción de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica y de la carnitiltransferasa producida por proliferadores peroxisómicos como el clofibrato o el Wy 14,643 en cultivos de hepatocitos (Watanabe y col., 1992). La proteincinasa C tiene un papel fundamental en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, y el incremento de la actividad de este enzima es el mecanismo de acción propuesto para otros carcinógenos, como los ésteres de forbol (Kiss, 1990). Algunos estudios evidencian que los ésteres de forbol, como el 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato, conocido activador de la proteincinasa C, induce, al igual que los proliferadores peroxisómicos, la actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica en rata (Watanabe y col., 1992). También se ha podido comprobar que otro derivado del ácido fíbrico, el ciprofibrato, es capaz de elevar las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular por inhibición de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplasmático, enzima que se ha propuesto



actuaría como un regulador negativo del crecimiento celular (Bennet y Williams, 1992). Por otro lado, los antagonistas del calcio, como nicardipina, nifedipina y diltiazem, suprimen la proliferación peroxisómica producida por clofibrato, aunque no la producida por dietas ricas en grasas (Itoga y col., 1990). Así, el efecto de proliferación peroxisómica inducida por fármacos se produciría por un mecanismo calcio-dependiente. La hipótesis más reciente es que los sistemas de transducción de señales, incluyendo el calcio intracelular, la calmodulina y la proteincinasa C, no pueden relacionarse con la iniciación del proceso de proliferación, sino con una fase más tardía de la inducción (Watanabe y col., 1992). Las alteraciones en la homeostasis del calcio podrían crear un ambiente más permisivo para la activación de múltiples procesos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes que conducirían a una liberación de los mecanismos de control del crecimiento, y por tanto, a la tumorigénesis.

## **IV. HIPERLIPOPROTEINEMIAS**

### **1. LIPOPROTEINAS**

Los lípidos presentes en el plasma sanguíneo son transportados unidos a apoproteínas, constituyendo las lipoproteínas. Estas son partículas esféricas diferenciadas en dos partes: una central, no polar, donde se sitúan los lípidos transportados (colesterol esterificado y triglicéridos) y una zona periférica formada por elementos polares (fosfolípidos, colesterol libre y proteínas) (Gómez Gerique, 1988).

El hecho de contener en su estructura una cantidad variable de lípidos hace que las lipoproteínas posean una densidad inferior a la del resto de las proteínas plasmáticas. En función de su densidad pueden clasificarse en cuatro tipos mayoritarios: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Además, existen algunas familias minoritarias de lipoproteínas, que pueden adquirir importancia en determinadas condiciones patológicas: lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteína a (Lp(a)).

Las principales características de las lipoproteínas se muestran en el siguiente cuadro (Gómez Gerique, 1991):

## Características de las lipoproteínas plasmáticas.

Lipoprot.	Fracción EF	Densidad	Transporte de:	Apoprot. mayoritarias
QM	-	Baja (<0.95)	TG Exógenos	B-48, AI, AII C, E
VLDL	pre-beta	Muy baja (0.95-1.006)	TG Endógenos	B-100, C, E
LDL	beta	Baja (1.006-1.063)	Colesterol (hacia las células)	B-100
HDL	alfa	Alta (1.06-1.125)	Colesterol (hacia el hígado)	AI, AII, C
IDL	beta	Intermedia (1.006-1.019)	Colesterol	B-100, E

## 2. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS

La mayoría de lípidos ingeridos en la dieta lo son en forma de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Para poder utilizarlos es necesaria su hidrólisis por la lipasa, colesterol esterasa y fosfolipasa pancreáticas en el intestino delgado. Los ácidos grasos libres así obtenidos penetran en el enterocito por difusión simple, y una vez transformados en acil-CoAs por acción de la acil-CoA sintetasa, son utilizados para resintetizar triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Estos son liberados a la linfa como lipoproteínas, principalmente como quilomicrones (QM), y de allí pasan al torrente sanguíneo. Durante su maduración, los QM adquieren apo E y apo C por intercambio con las HDL. Gracias a la presencia de apo CII puede actuar la lipoproteinlipasa del endotelio vascular (LPL) que metaboliza los

QM, de forma que la mayoría de los triglicéridos son eliminados, formándose los llamados QM remanentes, ricos en colesterol (Illingworth, 1987). La apoproteína E que éstos contienen es reconocida por los receptores hepáticos específicos que se encargan de su recaptación (Mahley y Angelin, 1984).

Los triglicéridos y el colesterol, además de proceder de la dieta, pueden ser sintetizados por el organismo, siendo el hígado su principal lugar de síntesis. El hígado empaqueta estos triglicéridos y parte del colesterol con determinadas apoproteínas y fosfolípidos formando las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que actúan como principales transportadores de los triglicéridos endógenos (Gómez Gerique, 1991). Las VLDL, después de sufrir un proceso de maduración en el que adquieren apo C a partir de las HDL, son catabolizadas por la LPL endotelial. Parte del material de superficie pasará a las HDL, y se formarán unas lipoproteínas de densidad intermedia o IDL. Las IDL pueden ser internalizadas por el hígado por la interacción con receptores hepáticos que reconocen la apo E (Illingworth, 1987), o bien transformarse en LDL por acción de la triglicérido lipasa hepática (TGL).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituyen el principal transportador de colesterol (Perry, 1986), de modo que una elevada concentración plasmática de LDL constituye un factor de riesgo aterogénico importante. Las LDL prácticamente han perdido todo su contenido en triglicéridos y parte de las apoproteínas (apo E y apo C). Son captadas por la mayoría de células extrahepáticas por medio de receptores específicos que reconocen las apoproteínas B y E (Brown y col., 1981; Patsch y col., 1989). Al internalizar las LDL, estas células se cargan de colesterol; cuando el reservorio de colesterol celular aumenta, resulta inhibida la síntesis de receptores para las LDL (Gómez Gerique, 1991).

Las células periféricas no pueden catabolizar el colesterol endógeno, de forma que el transporte de éste hacia el hígado, proceso llamado transporte reverso de colesterol y en el cual intervienen las lipoproteínas de alta

densidad (HDL), es crítico para mantener la homeostasis (Johnson y col., 1991). El colesterol no esterificado transloca desde las membranas internas donde se sintetiza hasta la membrana plasmática celular; de allí debe incorporarse a partículasceptoras del fluido intersticial, llamadas pre- $\beta$  HDL (Miller, 1990). Además de las HDL intersticiales intervienen también las HDL plasmáticas, de forma discoidal, que incorporan el colesterol no esterificado, junto con fosfolípidos y material de superficie procedente del catabolismo de otras lipoproteínas (Johnson y col., 1991). Durante su maduración, las HDL discoidales incorporan lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT), cuyo cofactor es la apo A-I, dando lugar a la fracción de las HDL<sub>3</sub>, pequeñas y muy densas. La LCAT cataliza la esterificación del colesterol, formándose las HDL<sub>2</sub>, muy ricas en ésteres de colesterol. La incorporación de apo E hace que las HDL<sub>2</sub> puedan ser internalizadas por el hígado a través de la interacción con los receptores específicos. Alternativamente, la actuación de la "colesterol ester transfer protein" (CETP) cataliza el intercambio de ésteres de colesterol por triglicéridos con las VLDL y LDL, las cuales, una vez cargadas de colesterol, pueden también interaccionar con los receptores apo E del hígado. Las HDL<sub>2</sub> ricas en triglicéridos revierten, por acción de la lipasa hepática (HL) o de la LPL en HDL<sub>3</sub> (Johnson y col., 1991). La importancia de las HDL se refleja en el hecho de que el porcentaje de riesgo de sufrir enfermedad coronaria aumenta mucho más al disminuir la concentración de HDL que el incrementarse la de LDL (Miller, 1990).

### **3. HIPERLIPOPROTEINEMIAS**

Reciben este nombre las alteraciones en la composición o concentración de las lipoproteínas plasmáticas, generalmente debidas a enfermedades de origen genético relacionadas con el metabolismo de éstas. No obstante, también pueden aparecer de forma secundaria a otras alteraciones metabólicas, como las inducidas por la obesidad, el alcoholismo, la ingesta de fármacos o determinadas enfermedades como la diabetes y el hipotiroidismo.

La importancia clínica de las hiperlipoproteinemias (niveles altos de LDL y/o VLDL con disminución de HDL) es debida a su estrecha relación con la arteriosclerosis. Esta es la principal causa de mortalidad precoz o de deterioro importante de la calidad de vida en los países industrializados (Carmena y col., 1989).

Clásicamente las hiperlipoproteinemias se han clasificado en seis fenotipos basados en la concentración de lipoproteínas presentes en el plasma (Frederickson y Lee, 1965):

Tipo I: Se caracteriza por el incremento en los niveles plasmáticos de QM. Es debida a una deficiencia en la LPL o a una alteración de su cofactor, la apo CII.

Tipo IIa: Se denomina también hipercolesterolemia familiar esencial, y se manifiesta por un aumento del colesterol y de las LDL, en tanto que el colesterol-HDL está disminuido. Los niveles de triglicéridos y de VLDL son normales.

Tipo IIb: Caracterizada por niveles de colesterol, LDL, triglicéridos y VLDL anormalmente altos.

Tipo III: Se caracteriza por una acumulación de IDL y quilomicrones residuales. Las concentraciones de triglicéridos y colesterol séricas se encuentran también incrementadas. El principal defecto bioquímico parece ser la incapacidad para eliminar las partículas residuales procedentes de las lipoproteínas ricas en triglicéridos tras la acción de la LPL. Este defecto probablemente está relacionado con una alteración estructural de la apoproteína E de estas partículas, que no sería reconocida por los receptores hepáticos. La apoproteína E presenta diversas variantes, definidas por tres alelos codominantes, llamados E<sup>2</sup>, E<sup>3</sup> y E<sup>4</sup>. Parece ser que todos los pacientes con hiperlipemia tipo III son homocigotos E<sup>2</sup>/E<sup>2</sup>, aunque además del fenotipo

deben concurrir otros factores genéticos o ambientales para que se exprese la enfermedad (Gómez Gerique, 1991).

**Tipo IV:** Se manifiesta por niveles elevados de VLDL, con la consiguiente hipertrigliceridemia, pero el colesterol-LDL mantiene sus niveles normales.

**Tipo V:** Se caracteriza por la acumulación de QM y de VLDL, y posiblemente está causada por un defecto en el catabolismo de los triglicéridos endógenos y exógenos.

**Tipo VI:** Las HDL se encuentran incrementadas, en tanto que los niveles de colesterol, triglicéridos, VLDL y LDL son normales.

Las formas más habituales en nuestro hábitat son la IIa y la IIb. El riesgo aterogénico es muy elevado para los que padecen estos dos fenotipos, alto para los tipos III y IV, y bajo para las formas I y V.

Aunque la clasificación fenotípica tiene su utilidad como descripción del cuadro lipoproteico, da poca información sobre la etiología del desorden lipídico. Según el tipo de alteración genética, se clasifican en mono o poligénicas (afectación de uno o más de un gen). Son monogénicas la disbetalipoproteinemia familiar (asociada al fenotipo III), y la hipercolesterolemia familiar, asociada a los fenotipos IIa y IIb. Esta última es debida a una mutación en el gen que codifica para el receptor LDL. Dentro de las alteraciones poligénicas destacan la hipercolesterolemia familiar poligénica (fenotipo IIa) y la hiperlipemia familiar combinada, que se caracteriza por incrementos en la síntesis de VLDL y LDL por sobreproducción de apo B-100, presente en ambas lipoproteínas.

La elevación de los niveles de colesterol-LDL en sangre está directamente relacionada con la incidencia de enfermedad coronaria

isquémica (Perry, 1986). La iniciación de la lesión aterosclerótica se cree que tiene lugar a través de la exposición de las células de la íntima arterial a las LDL modificadas oxidativamente (Plane y col., 1992). Estas son internalizadas por los macrófagos vía el llamado receptor "scavenger", o receptor de LDL modificadas, el cual, a diferencia del receptor apo B,E, no es regulable por la concentración intracelular de colesterol (Gómez Gerique, 1991). La acumulación de éste convertiría los macrófagos en "células espumosas", que constituyen la fase inicial del proceso aterogénico.

Si bien el papel del colesterol está claro, no se sabe aún si la relación entre hipertrigliceridemia y aterosclerosis es causal o casual, aunque las evidencias son suficientes para justificar la instauración de tratamiento (Hawkins y col., 1987).

El tratamiento de las hiperlipoproteinemias consiste en la combinación de diversas estrategias: instauración de una dieta que mantenga el peso corporal y minimice las concentraciones plasmáticas de lípidos, ejercicio físico, control de la tensión arterial y de los niveles de glucosa en diabéticos, y eliminación de hábitos que pueden empeorar el pronóstico de la enfermedad, como el tabaquismo.

En las formas secundarias debe tratarse siempre primero la causa inicial.

Si los anteriores recursos no han tenido éxito, es cuando debe recurrirse a la terapia farmacológica, escogiendo el principio activo en función del tipo de hiperlipoproteinemia que se pretenda tratar:



## Tratamiento farmacológico de las hiperlipoproteinemias

Tipo	1ª Elección	2ª Elección
IIa	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Resinas: colestiramina, colestipol</li> <li>. Acido nicotínico</li> <li>. Inhib. HMGC<sub>o</sub>A Rd: lovastatina, simvastatina</li> <li>. Der. ácido clofibrico: fenofibrato, bezafibrato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Probucol</li> <li>. Gemfibrozilo</li> <li>. Neomicina</li> </ul>
IIb	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Acido nicotínico</li> <li>. Inhib. HMGC<sub>o</sub>A Rd: lovastatina, simvastatina</li> <li>. Der. ácido clofibrico: gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Colestiramina</li> <li>. Colestipol</li> <li>. Clofibrato</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Acido clofibrico</li> <li>. Der. ácido clofibrico: gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato</li> <li>. Inhib. HMG CoA Rd: lovastatina, simvastatina</li> <li>. Acido nicotínico</li> </ul>	
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Gemfibrozilo</li> <li>. Acido nicotínico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Clofibrato</li> <li>. Bezafibrato</li> <li>. Gemfibrozilo</li> </ul>

## V. DERIVADOS DEL ACIDO FIBRICO

### 1. GENERALIDADES

Los fibratos son una familia de fármacos hipolipemiantes estructuralmente relacionados que se comportan como proliferadores peroxisómicos, al menos en diversas especies de mamíferos, por ejemplo en los roedores (Latruffe, 1992). Las implicaciones del fenómeno de la inducción peroxisómica, que no solo causan los fibratos sino un amplio grupo de compuestos de muy distinta estructura y acción, se han revisado en el capítulo III de esta parte teórica.

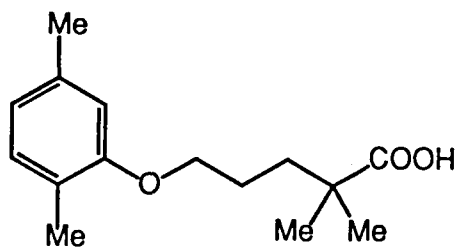
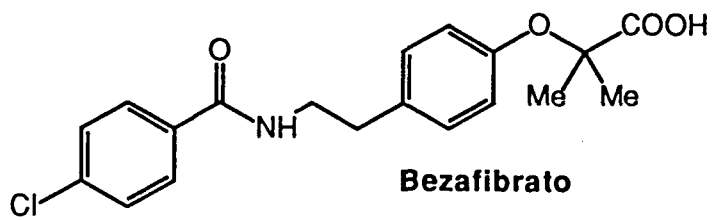
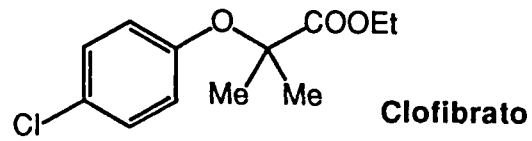
El más antiguo miembro de esta familia, y por tanto el más estudiado, es el ácido clofibrico o su éster clofibrato, considerado como hipolipemiante de referencia. En la figura 8 se muestra su estructura química, junto con la de los otros dos fármacos que son objeto de este trabajo, bezafibrato y gemfibrozilo. Puede observarse que todos ellos son ácidos carboxílicos con una agrupación isobutírica terminal. Asimismo, todos presentan un anillo aromático. El clofibrato se administra en forma de éster, pero una vez ingerido se hidroliza rápidamente por esterases plasmáticas a su forma activa, ácido clofibrico (Cayen, 1985).

Cuando se utilizan en clínica producen los siguientes efectos (Eisenberg, 1990; Todd y Ward, 1988; Monk y col., 1987):

- Importante disminución de los niveles de triglicéridos asociados a VLDL y IDL
- Incremento significativo de los niveles de colesterol-HDL
- Reducciones variables en el nivel de colesterol-LDL

A continuación se detallan algunas de las características más importantes de los tres fibratos estudiados en este trabajo: clofibrato (CFB),

bezafibrato (BFB) y gemfibrozilo (GFB) (Figura 8).



**Figura 8. Estructura molecular de Clofibrato, Bezafibrato y Gemfibrozilo.**

Como puede observarse en la anterior Figura, todos ellos son ácidos ariloxialcanoicos, pero el GFB es claramente distinto a CFB y BFB ya que contiene grupos metil en la porción fenoxi de la molécula, y grupos metileno entre el anillo y la función isobutírica (McGuire y col., 1992). Por otro lado, es el único de los tres cuya molécula no está halogenada.

## **2. CARACTERISTICAS FARMACOCINETICAS**

Todos los fibratos, a excepción del fenofibrato, se absorben muy bien por vía oral. Como ya se ha comentado, el clofibrato, y también el fenofibrato son rápidamente hidrolizados por las esterasas séricas y tisulares a las formas ácidas, que son las farmacológicamente activas (Thorp, 1972).

Los niveles plasmáticos de fármaco se incrementan linealmente con la dosis. Para los tres fármacos estudiados en este trabajo, los niveles plasmáticos máximos después de su administración oral son:

- CFB: desde 35  $\mu\text{g/ml}$  (0.16 mM) tras una dosis de 500 mg (Houin y col., 1975), hasta 160-200  $\mu\text{g/ml}$  (0.74-0.93 mM) después de la administración de una dosis de 2000 mg (Gugler y Hartlapp, 1978).

- BFB: aunque se absorbe más rápidamente que el clofibrato, da lugar a concentraciones plasmáticas más bajas (10-14 mg/l, 0.028-0.038 mM, tras una dosis única de 300 mg), debido a un mayor aclaramiento renal y a la ausencia de acumulación del fármaco (Abshagen y col., 1979).

- GFB: después de la administración de tres dosis diarias de 600 mg, la concentración máxima en plasma oscila entre 15 y 25  $\mu\text{g/ml}$  (0.06-0.1 mM) (Okerholm y col., 1976).

Los fibratos se unen en gran proporción a las proteínas plasmáticas, sobre todo a la seroalbúmina (97 % en el caso del CFB, 94-96 % para el BFB,

87-98 % para el GFB) (Cayen y col., 1981; Gugler y col., 1975). La elevada unión de éstos fármacos a las proteínas limita su distribución en los tejidos. El GFB presenta fenómenos de acumulación: en ratas, las concentraciones plasmáticas de éste fármaco son excedidas por los órganos involucrados en el metabolismo y la excreción, es decir, hígado y riñón (Todd y Ward, 1988). La afinidad de éstos fármacos por la albúmina hace que desplacen a la tiroxina de su lugar de unión a ésta (Thorp, 1972). El incremento del metabolismo lipídico debido al aumento de los niveles de tiroxina no parece ser determinante para la actividad de estos fármacos (Nazareth y col., 1974). También existe competencia entre los ácidos grasos y los fibratos por los lugares de unión a la albúmina. El desplazamiento producido por los fibratos es más pronunciado a medida que aumenta la longitud de cadena del ácido graso (Meisner, 1979).

Las vidas medias plasmáticas oscilan enormemente, entre las 1.3 horas para el CFB y las 27 horas para el fenofibrato. En el caso del BFB, prácticamente el 100 % de la dosis administrada se excreta a las 48 horas. La excreción se realiza principalmente por la orina (Houin y col., 1975; Abshagen y col., 1977). Respecto a la forma en que se excretan, el 60-95 % del CFB es excretado como ésteres del ácido glucurónico, mientras que el BFB se excreta en gran parte (43 %) inalterado (Abshagen y col., 1979), y el GFB en forma de metabolitos hidroxilados y conjugados con ácido glucurónico, a excepción del ácido benzoico (Okerholm y col., 1976).

### **3. EFECTOS ADVERSOS. CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES**

Los efectos adversos más comunes producidos por los fibratos son trastornos de tipo gastrointestinal, como náuseas, diarrea, dispepsia etc. Raramente aparecen efectos más graves, como disfunción hepática,

dermatitis, depresión de la médula ósea, impotencia etc. (Sgro y Escousse, 1991).

Cabe destacar los siguientes fenómenos tóxicos que pueden ser provocados por fibratos (Todd y Ward, 1988; Monk y col., 1987):

- Inducción de un síndrome similar a una miositis, con aparición de mialgias, artralgias, debilidad muscular, etc. Este fenómeno aparece frecuentemente en pacientes con síndrome nefrótico u otras disfunciones que cursen con hipoalbuminemia, sobre todo en el caso del CFB.

- Inducción de intolerancia a la glucosa en pacientes susceptibles.

- Incremento del riesgo litogénico, debido al incremento de la concentración biliar de colesterol, principalmente en pacientes tratados con CFB.

- El clofibrato es el único fibrato para el cual se ha podido demostrar un cierto incremento, después de tratamientos crónicos muy prolongados, de tumoraciones gastrointestinales en la especie humana.

Como norma general, los fibratos están contraindicados en aquellas personas que presenten problemas de funcionalismo renal o hepático. Igualmente, debe evitarse su uso en mujeres gestantes, lactantes y niños de corta edad.

Las contraindicaciones respecto al uso de otros fármacos se deben fundamentalmente a la posibilidad de que los fibratos puedan provocar el desplazamiento de la unión de éstos a la albúmina. Así, debe prestarse especial atención a la asociación de fibratos con furosemida, hipoglucemiantes y anticoagulantes orales.

#### **4. USO CLINICO**

El CFB se había venido considerando fármaco de elección en el tratamiento de los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo III, en el cual la dieta y la corrección de los factores secundarios no son suficientes para normalizar los valores plasmáticos de lípidos. En estos pacientes se han conseguido reducir los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos entre un 50 y un 80 %, además de producir la regresión de los xantomas (Illingworth, 1987). La alta incidencia de colelitiasis y de tumores malignos limita su utilización a los pacientes con este fenotipo (Dujovne y Harris, 1989), e incluso en éstos está siendo sustituido por otros fibratos, como BFB y GFB. Se considera de segunda elección en las dislipemias del tipo IIb, en que las VLDL se encuentran aumentadas.

El BFB se utiliza principalmente para tratar hiperlipoproteinemias primarias de los tipos IIa, IIb, IV y también algunas dislipemias secundarias (Monk y Todd, 1987). En general, se utiliza más en los casos en que predomina el incremento de los niveles de colesterol sobre los de triglicéridos.

Finalmente, el GFB, por su buena tolerancia y alta efectividad, puede ser considerado fármaco de primera elección en todos los tipos de dislipemias caracterizadas por hipertrigliceridemia, excepto en el caso del fenotipo I (Todd y Ward, 1988). En concreto, el GFB ha mostrado ser muy efectivo en la reducción de los niveles de triglicéridos y VLDL en pacientes con fenotipos II y IV (Keseaniemi y Grundy, 1984). Además, parece ser que es el único que ha demostrado ser efectivo respecto a la reducción de la mortalidad cardiovascular en estudios clínicos.

#### **5. EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE LOS FIBRATOS**

El CFB actúa principalmente incrementando el catabolismo de las VLDL por estimulación de la lipoproteinlipasa (Taylor y col., 1977;

Kudchodker y col., 1984). También se producen pequeñas disminuciones en la síntesis y/o secreción de VLDL, pero el fármaco es poco efectivo en este sentido (Perry, 1986). El efecto hipocolesterolemiante del CFB es menos intenso y más variable.

El BFB reduce las concentraciones de triglicéridos y colesterol total en plasma (Oster y col., 1985). Al igual que el CFB, la reducción en los niveles de triglicéridos se produce por el incremento en el catabolismo de las VLDL por estimulación de la lipoproteinlipasa (Shepherd y col., 1984). Este efecto puede ser debido al incremento que el BFB produce en la concentración de la apoproteína CII, que activa la lipoproteinlipasa, mientras que los niveles de apoproteína CIII, que inhibe este enzima, no se modifican (Monk y Todd, 1987). En estudios en animales se ha visto que el BFB inhibe la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoA RD) (Berndt y col., 1978), enzima velocidad limitante para la síntesis de colesterol, y la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT) (Hudson y Day, 1982), enzima que cataliza la esterificación del colesterol. Aunque esta inhibición de la síntesis de colesterol no se ha confirmado en la especie humana, se ha visto que el BFB incrementa la actividad del receptor de las LDL, que depende de la concentración intracelular de colesterol, en pacientes del fenotipo II (Stewart y col., 1982). En cambio, en pacientes del fenotipo IV, la terapia con BFB puede incrementar los niveles de colesterol-LDL. El colesterol-HDL resulta incrementado, tanto más cuanto menores sean las concentraciones iniciales de dicha lipoproteína.

Respecto al GFB, resulta un orden de magnitud más potente que el CFB respecto a la reducción de los niveles plasmáticos de triglicéridos (Dvornik y Cayen, 1980). A diferencia del CFB, la reducción en los niveles de triglicéridos se debe principalmente a la inhibición de su síntesis, y, por tanto, a la disminución de la producción de VLDL por el hígado (Keseaniemi y Grundy, 1984). Por otra parte, también incrementa el catabolismo de éstas lipoproteínas por estimulación de la lipoproteinlipasa. Respecto al colesterol,



el tratamiento con GFB provoca disminución de las concentraciones de colesterol total e incremento del colesterol-HDL (Agustin y Gnasso, 1985).

## **6. MECANISMOS BIOQUIMICOS DE ACCION**

### **6.1. Fenómenos que afectan las vías de síntesis lipídica**

Los fibratos, al menos en animales de experimentación son capaces de modificar numerosas actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis o con la modificación de ácidos grasos. Hay que tener en cuenta que el tipo de ácido graso presente en los glicerolípidos de las lipoproteínas puede influir enormemente sobre el metabolismo de éstas; así, la LPL resulta incrementada en función del grado de insaturación de los ácidos grasos de las lipoproteínas sobre las que actúa (Desreumaux y col., 1979); igualmente, la actividad LCAT es modulada por los ácidos grasos monoinsaturados (Lagrost y col., 1991).

A continuación se expone la información existente sobre las acciones *in vitro* e *in vivo* que producen los fibratos sobre los enzimas implicados en las vías de síntesis de ácidos grasos y lípidos más complejos.

La ácido graso sintasa citosólica resulta ligeramente inhibida *in vitro* por los fibratos (Sánchez y col, 1993a), aunque esta inhibición se produce a concentraciones muy superiores a las consideradas fisiológicas. La acetil-CoA carboxilasa, enzima clave en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, también es inhibida *in vitro* por CFB, BFB y GFB, siendo este último el más potente (Sánchez y col., 1993a).

Respecto a la modificación de las cadenas ya preformadas de los ácidos grasos, se ha descrito que el tratamiento con CFB produce una estimulación de la actividad esteroil-CoA desaturasa (delta-9) (Kawashima y Kozuka, 1982) y de la palmitoil-CoA elongasa (Kawashima e Hiroshi, 1985). El efecto

de los fibratos sobre la elongación de ácidos grasos es controvertido, pues otros autores han descrito una disminución de su actividad tras el tratamiento de ratas con CFB (Landriscina y col., 1977). En los estudios sobre el efecto *in vitro* de CFB, BFB y GFB sobre la elongación de palmitoil-, palmitoleoil- y gamma-linolenil-CoA, se ha visto que las tres actividades resultan fuertemente inhibidas (Sánchez y col., 1993). Por otro lado, estos mismos fármacos inhiben *in vitro* las actividades delta-6 y delta-5 desaturasa, mientras que no modifican la delta-9 (Sánchez y col., 1993).

Las cadenas de transporte electrónico microsomal, encargadas de suministrar equivalentes reductores para la elongación y la desaturación de ácidos grasos, también sufren modificaciones en su actividad tras la administración de fibratos. Por ejemplo, se ha descrito que el BFB (Facino y Carini, 1981), y el CFB (Platt y Cockrill, 1969), entre otros, aumentan la actividad NADPH citocromo c reductasa; en cambio, en ratas tratadas con CFB, parece ser que disminuye la actividad NADH citocromo c reductasa (Kawashima y col., 1989). En los estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, únicamente se registró una estimulación de la actividad NADH citocromo c reductasa, sobre todo por parte del GFB, mientras que la NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa y la NADPH citocromo c reductasa no resultaron afectadas (Alegret y col., 1991)

Como ya se ha comentado, dos enzimas claves en el control de la disponibilidad de sustrato para la elongación y la desaturación son la acil-CoA hidrolasa y la acil-CoA sintetasa. Los efectos de los fibratos sobre estas actividades enzimáticas son:

- La actividad acil-CoA sintetasa microsomal se incrementa por el tratamiento con CFB, sin que varíe su especificidad de sustrato (Kawashima y col., 1984); sin embargo, los derivados fibráticos causan una ligera disminución de esta actividad en los ensayos *in vitro* (Sánchez y col., 1993).

- La administración de ácido clofibrato no produce modificaciones importantes en la actividad acil-CoA hidrolasa microsomal (Berge y col., 1984). En cambio, la actividad acil-CoA hidrolasa del citosol hepático se incrementa unas 10 veces tras el tratamiento con clofibrato (Katoh y col., 1987), debido a la inducción de las llamadas hidrolasas citosólicas I y II, distintas entre sí y distintas a las formas microsomal y mitocondrial (Miyazawa y col., 1981).

También resultan afectadas por el tratamiento con fibratos algunas actividades enzimáticas que intervienen en la síntesis de fosfolípidos. Así, la administración de CFB produce estimulación de la 1-acil-glicerofosforilcolina aciltransferasa y de la 1-acil-glicerofosfato aciltransferasa (Pollard y Brindley, 1982; Das y col., 1983). Estos incrementos, junto con el aumento de proporción relativa de 18:1 debido a la inducción de los sistemas de elongación y desaturación, da lugar a cambios en la composición de la fosfatidilcolina de la membrana microsomal, que presenta una proporción aumentada de 18:1 y reducida de 18:2 (Kawashima y col., 1984).

Respecto a la inhibición de la síntesis hepática de triglicéridos, se ha descrito que los fibratos producen un incremento de la actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, hecho que implicaría la desviación del glicerol fosfato de la ruta sintética de triglicéridos hacia otros procesos. Por otra parte, la incorporación de palmitato resulta disminuida tras la administración de fibratos. Sin embargo, es difícil separar estos efectos del fenómeno de la inducción peroxisómica que producen los fibratos (Herrera y col., 1988).

Existe controversia sobre el efecto de los fibratos sobre un enzima clave en la biosíntesis de colesterol, la HMG-CoA RD, dado que algunos trabajos registran un incremento en esta actividad y otros no. Los estudios *in vitro* indican que CFB y BFB actúan como inhibidores no competitivos de este enzima. De todos modos, la potencia inhibidora sobre este enzima que presentan los fibratos resulta muy inferior a la de las estatinas (Newton,

1985).

En microsomas de rata, los fibratos inhiben la actividad ACAT de manera evidente. Si esta inhibición se reproduce a nivel intestinal y arterial, puede representar un efecto antiaterosclerótico independiente del efecto estrictamente hipolipemiente (Stahlberg y col., 1989).

## **6.2. Acción sobre las vías de catabolismo lipídico**

Como se comenta de manera más extensa en el capítulo dedicado a los peroxisomas, la administración de fibratos produce en roedores el llamado fenómeno de la inducción peroxisómica, que se caracteriza por la proliferación de los peroxisomas y el incremento de actividades enzimáticas asociadas a ellos. La  $\beta$ -oxidación peroxisómica, o en concreto el enzima velocidad limitante del proceso, la acil-CoA oxidasa, son enzimas del catabolismo de ácidos grasos cuya actividad resulta enormemente incrementada tras la administración de fibratos a roedores.

Mientras algunos autores (Eacho y Foxworthy, 1988) consideran que la inhibición de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial es la causa de la inducción del sistema peroxisómico como respuesta adaptativa del organismo, otros abogan por una inducción coordinada de ambos sistemas (Brady y col., 1989). La inducción de la carnitin acetiltransferasa (su actividad aumenta más de 10 veces en ratas tratadas con CFB) facilita el transporte del acetyl-CoA extramitocondrial a la matriz de la mitocondria para su  $\beta$ -oxidación (Christiansen y col., 1978).

A la inducción de la acil-CoA oxidasa por tratamiento con fibratos la precede en el tiempo la inducción del citocromo P450IVA1, enzima que hidroxila los ácidos grasos de larga cadena produciendo ácidos dicarboxílicos,

los cuales son sustrato de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica. La inducción del citocromo P450IVA1 parece ser el fenómeno inicial del proceso de la proliferación peroxisómica (Kaikaus y col., 1993).

También se ha descrito la inducción por tratamiento con CFB de las tres acil-CoA deshidrogenasas mitocondriales que intervienen en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena simple, mientras que no modifica las que actúan sobre ésteres CoA de ácidos grasos de cadena ramificada (Veitch y col., 1988).

Por último, el tratamiento con fibratos produce un incremento en la expresión de la FABP, con un orden de potencia igual al exhibido por estos compuestos respecto a su capacidad para inducir proliferación peroxisómica (Cannon y Eacho, 1991). El paralelismo entre la inducción de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica y la de las FABP sugiere una implicación directa de éstas en dicho sistema enzimático (Kaikaus y col., 1993).

Respecto a las vías catabólicas de las lipoproteínas, el fenómeno mejor descrito en humanos es el incremento de la actividad lipoproteinlipasa (LPL) vascular (Shepherd y col., 1984). Este se considera uno de los mecanismos principales de los fibratos respecto a su efecto hipotrigliceridemiante. Una de las causas del incremento de la actividad LPL podría ser el incremento de la relación apo CII/apo CIII (Roberts, 1989). El efecto de éstos fármacos sobre la lipasa hepática es más controvertido: el fenofibrato parece disminuir la actividad de este enzima en rata y aumentarla en humanos, mientras que el gemfibrozilo no la modifica (Staels y col., 1992; Schwandt, 1991; Simpson y col., 1990).

### **6.3. Relación con el efecto hipolipemiante**

La profunda alteración del metabolismo lipídico tras la administración de fibratos no está relacionada de forma clara con el efecto hipolipemiante de

estos fármacos.

Algunos autores han propuesto que la inducción del citocromo P450IVA1, y por tanto, el incremento de la  $\omega$ -oxidación de los ácidos grasos, podría contribuir al efecto hipotrigliceridemiante, ya que esta vía compite con la vía biosintética de los triglicéridos por el mismo sustrato, los ácidos grasos (Hawkins y col., 1987). Sin embargo, la  $\omega$ -oxidación supone únicamente un 5-10 % de la oxidación total de los ácidos grasos en ratas en ayuno.

La inducción de los enzimas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial es, probablemente, el mecanismo bioquímico que contribuye más al efecto hipolipemiante, junto con el incremento de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica, aunque ésta representa sólo un 10 % de la oxidación de los ácidos grasos en rata en condiciones normales (Mannaerts y col., 1979).

La relación entre el fenómeno de la inducción peroxisómica y el efecto hipolipemiante no está clarificada. Aunque algunos estudios han demostrado una asociación entre la proliferación peroxisómica y la actividad hipotrigliceridémica (Moody y Reddy, 1982), de hecho la actividad hipolipemiante de los fibratos está demostrada en la especie humana, en la que no se produce inducción peroxisómica. Por otra parte, en ratas tratadas con CFB, BFB y GFB, el efecto hipolipidémico no es dependiente de la dosis y no se correlaciona con la proliferación de los peroxisomas (Stegmeier y col., 1982; McGuire y col., 1992). La conclusión de los estudios más recientes es que la proliferación peroxisómica no es la causa de la hipolipidemia (Moody y col., 1992).



## **PARTE EXPERIMENTAL**





## **METODOLOGIA**



## 1. CONDICIONES GENERALES

### 1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley macho y cobayas Dunkin-Hartley macho, ambos proporcionados por Letica (Barcelona), de peso comprendido entre 110-140 g en el caso de las ratas y 300-380 g en el caso de las cobayas en el momento de iniciar el tratamiento. Los animales se han mantenido estabulados con dieta estándar Panlab y agua *ad libitum*, a una temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  y un ritmo circadiano de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (8 A.M. - 8 P.M.), durante los 5 días previos al inicio del estudio.

El tratamiento farmacológico de los animales se ha realizado administrando los fármacos conjuntamente con la dieta, a dosis equimolares calculadas tomando como base la dosis habitual a la que se administra el clofibrato según la bibliografía: 0.3 % p/p (Berge y Aarsland, 1985; Berge y Bakke, 1981). Las dosis equimolares correspondientes al bezafibrato y al gemfibrozilo son 0.450 y 0.309 % respectivamente. Para preparar las dietas se disolvieron los fármacos en acetona, se impregnó la dieta con esta solución (en una proporción de 0.85 l de solución acetónica por kg de dieta) y se evaporó el solvente bajo una corriente de aire tibio. La dieta control se preparó de igual modo utilizando acetona pura. Una vez preparadas, las dietas se dejaron secar al aire libre durante toda la noche y se guardaron un máximo de 15 días en recipientes cerrados a  $4^\circ\text{C}$ .

Se han utilizado 25 ratas en cada tanda de tratamientos (6 tratamientos en total): una ha servido de control en el día 0 de inicio del tratamiento, y las 24 restantes se asignaron aleatoriamente a cada uno de los cuatro grupos de tratamiento (control, clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo) en función de su peso. Los tratamientos han tenido una duración de 15 días,

en los cuales se ha sacrificado de forma aleatoria una rata de cada grupo de tratamiento en los días 1, 2, 4, 7, 10 y 15.

En el caso de las cobayas, 12 animales se han asignado al azar según su peso a dos grupos de tratamiento, control y gemfibrozilo, y se han sacrificado al cabo de 15 días.

Diariamente se ha procedido a controlar el peso corporal de los animales en estudio, así como la cantidad de alimento ingerida por los mismos.

## **1.2. OBTENCION DE LAS FRACCIONES CELULARES HEPATICAS**

Los animales se han sacrificado entre las 8 y las 9 de la mañana por dislocación cervical y posterior exsanguinación. El método seguido para la obtención de las fracciones celulares hepáticas fue el descrito por Nagi y col. (1989), con ligeras modificaciones. El hígado se extrae y se perfunde con solución salina de NaCl al 0.9 % para eliminar la hemoglobina. Seguidamente se homogeniza en tampón Tris-HCl 50 mM + sacarosa 0.25 M, pH 7.4 (proporción 1:8) utilizando un homogenizador Politron (rotor PTA 20 TS, posición 5) durante 10 segundos, manteniendo el tejido en un baño de hielo para evitar la degradación de los enzimas tisulares.

El homogenado hepático así obtenido se centrifuga a 700 g (2500 rpm) durante 10 minutos. El pellet, que contiene los núcleos y los fragmentos de células se descarta. Del sobrenadante, se toma una pequeña alícuota y el resto se centrifuga de nuevo a 7800 g (8000 rpm) 15 minutos.

Tras esta centrifugación se obtiene un pellet que contiene la fracción de mitocondrias pesadas, el cual se resuspende en tampón fosfato potásico 100 mM + EDTA 1 mM + KCl 0.15 M pH 7.4, y vuelve a centrifugarse en las

mismas condiciones. Finalmente se resuspende en un pequeño volumen de Tris-HCl 100 mM pH 7.4.

El sobrenadante de la segunda centrifugación vuelve a centrifugarse durante 15 minutos a 17400 g (12000 rpm), obteniéndose un pellet que contiene las mitocondrias ligeras, las cuales se resuspenden y vuelven a ser centrifugadas de igual manera que las mitocondrias pesadas. Todas estas operaciones se llevan a cabo utilizando una centrífuga preparativa Beckmann (J2-21) de alta velocidad refrigerada a 4° C.

El último sobrenadante obtenido se centrifuga en una ultracentrífuga Beckmann L8-55M durante 45 minutos a 100000 g (40000 rpm, rotor Ty 45.1) para obtener un sobrenadante que corresponde a la fracción citosólica, y un pellet que contiene los microsomas. Este pellet se resuspende en tampón Tris-HCl 20 mM + KCl 0.15 M, para eliminar las proteínas citosólicas o de matriz que pudieran quedar adheridas a la superficie de los microsomas, y se vuelve a centrifugar a 40000 rpm durante 45 minutos. El pellet microsomal se resuspende finalmente en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4.

Todas las resuspensiones se han realizado utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem (posición 5-6, 10 segundos) y manteniendo el tubo que contiene el tejido en un baño de hielo.

Las diversas fracciones obtenidas, después de determinar su concentración proteica por el método de Bradford (ver sección 1.5) se congelaron a -30° C un máximo de una semana hasta su utilización, excepto en el caso de las determinaciones de los sistemas de elongación y desaturación, que se han realizado en el mismo día en que se obtuvo la fracción microsomal.

### **1.3. ESTUDIOS DE DISTRIBUCION SUBCELULAR**

Con el fin de obtener fracciones lo suficientemente puras y con un alto rendimiento para realizar los ensayos de distribución subcelular, se realizaron algunas modificaciones en el proceso de fraccionamiento celular expuesto en la anterior sección.

El hígado se homogeniza en tampón Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM + KCl 0.15 M + sacarosa 0.25 M pH 7.4 (tampón A), en proporción 1:4. Para que el proceso sea lo suficientemente suave como para mantener viables el máximo de orgánulos celulares, la homogenización se realiza utilizando un Potter-Elvehjem, en posición 4-5 durante unos 10 segundos. El homogenado se filtra para eliminar las partículas más groseras, que precipitarían conjuntamente con los núcleos, y se le añade cantidad suficiente de tampón A para llegar a la proporción 1:10.

El homogenado obtenido se centrifuga a 700 g (2500 rpm) durante 5 minutos, obteniéndose un pellet, que contiene la fracción nuclear, el cual se lavará 3 veces con tampón A, resuspendiéndolo finalmente en el mismo tampón. Para eliminar los orgánulos contaminantes y las células enteras que pudieran haber precipitado conjuntamente con los núcleos, se ha seguido el método de Storrie y Madden (1990). Para ello, por cada 2 ml de la suspensión del pellet nuclear, se le añaden 0.3 ml de una mezcla que contiene 1 parte de deoxicolato sódico (Sigma) al 10% y 2 partes de Tween 80 al 10% en agua. La suspensión se agita vigorosamente durante 3 segundos y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspende finalmente en sacarosa 0.25 M.

El sobrenadante de la primera centrifugación junto con los líquidos de lavado de los núcleos se centrifuga a 7800 g (8000 rpm) durante 15 minutos, obteniéndose un pellet que después de 2 lavados con tampón A, se resuspende finalmente en tampón fosfato 100 mM + EDTA 1 mM pH 7.4, constituyendo

la fracción de las mitocondrias pesadas.

Los líquidos de lavado de ésta fracción, juntamente con el sobrenadante, se centrifugan a 25700 g (15000 rpm) durante 10 minutos, obteniéndose un pellet que contiene las mitocondrias ligeras. Este se lava una vez con tampón A y se resuspende en el mismo tampón que las mitocondrias pesadas.

Todas estas operaciones se realizan utilizando una centrífuga Beckmann de alta velocidad (J2-21) refrigerada a 4° C.

El último sobrenadante obtenido junto con el líquido de lavado de las mitocondrias ligeras se centrifuga a 100000 g (40000 rpm) durante 45 minutos a 4° C (ultracentrífuga Beckmann L8-55M, rotor Ty 40). El pellet se resuspende en tampón A y vuelve a centrifugarse en las mismas condiciones para obtener el pellet microsomal, que se resuspende finalmente en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4. El líquido de lavado junto con el sobrenadante de la primera ultracentrifugación constituye la fracción citosólica.

Las diversas fracciones obtenidas, después de determinar su concentración proteica por el método de Bradford (sección 1.5), se congelaron a - 30° C un máximo de una semana hasta su utilización.

#### **1.4. OBTENCIÓN DE PLASMA**

Las muestras de sangre se obtienen en el momento de la exanguinación del animal, recogiendo 5 ml en un tubo de plástico que contiene 150 µl de solución de EDTA al 5 %. Seguidamente se centrifuga a 3000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante (plasma) se utiliza para la determinación de colesterol y triglicéridos.



## 1.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

Para determinar la concentración proteica de las diversas fracciones subcelulares se ha utilizado el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual elimina la mayor parte de los problemas que presentan otros métodos, como los de Lowry y Biuret.

Se utiliza un colorante, Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), que es de color rojo y se transforma en azul al unirse a las proteínas. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo cual permite una alta sensibilidad en la medida de la concentración proteica. La unión del colorante a la proteína es un proceso rápido, y el complejo formado es muy estable.

Para preparar el reactivo, 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 se disuelven en 50 ml de etanol al 95 %. A esta solución se le añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85 %, se completa el volumen con agua hasta 1 l y se filtra por algodón.

La concentración proteica de la muestra se determina por interpolación con una recta de calibrado que se prepara utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) como patrón (2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g}$ ). La recta se realiza cada vez que se desea determinar la concentración proteica. Se prepara también un blanco y cuatro tubos con dos volúmenes diferentes de una dilución de la muestra. Se completa el volumen de cada tubo con agua destilada hasta 50  $\mu\text{l}$  y se le añade 1 ml del reactivo de Bradford. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se procede a la lectura de la absorbancia a 595 nm.

## 2. PARAMETROS ENZIMATICOS

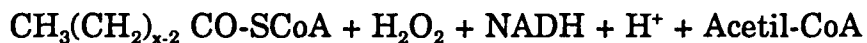
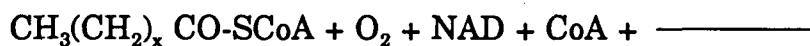
### 2.1. METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

La determinación de actividades enzimáticas por métodos espectrofotométricos se ha llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Perkin Elmer 550S) termostatzado y con accesorio registrador.

#### 2.1.1. $\beta$ -oxidación peroxisómica

##### Fundamento

La  $\beta$ -oxidación peroxisómica es un proceso por el cual los acil-CoAs se degradan, perdiendo dos átomos de carbono en cada ciclo. La estequiometría completa de cada ciclo, que incluye cuatro reacciones enzimáticas es la siguiente:



El método de Paul B. Lazarow (1981) determina el producto total de la  $\beta$ -oxidación utilizando como substrato palmitoil-CoA. Este método se basa en la medida espectrofotométrica (a 340 nm) de la reducción del NAD a NADH, y puede aplicarse a una fracción subcelular si se adiciona KCN como inhibidor de la reoxidación del NADH formado.

## Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Tris-HCl pH 8.0	50 mM	cantidad suf. para 1 ml	50 mM
KCN (Panreac)	50 mM	20 µl	1 mM
BSA libre de ácidos grasos (Sigma)	3.75 mg/ml	20 µl	0.075 mg/ml
DTT (Sigma)	50 M	20 µl	1 mM
Tritón X-100 (Scharlau)	462 µl/100 ml	20 µl	0.09 µl/ml
FAD (Sigma)	0.5 mM	20 µl	10 µM
CoA (Sigma) (*)	7.5 mM	13.33 µl	100 µM
NAD (Sigma)	5 mM	40 µl	200 µM
Palmitoil-CoA (Sigma)	1 mM	20 µl	20 µM

(\*): Las soluciones de coenzima A, así como las de todos sus derivados han sido preparadas siempre en tampón fosfato monopotásico pH 6.3, para asegurar su correcta conservación.

## Metódica

Para cada determinación se utilizan dos cubetas, una para el blanco y otra en que se efectuará la reacción. A cada cubeta se le añaden los volúmenes de reactivos indicados (excepto el palmitoil-CoA) más el volumen necesario de sobrenadante de la primera centrifugación del homogenado

hepático. Se agitan las cubetas y se mantienen a 37° C durante 2 minutos en el espectrofotómetro termostatizado. La reacción se inicia añadiendo 20 µl de palmitoil-CoA (en la cubeta blanco se añadirá el mismo volumen, pero en este caso de tampón), y se mide el incremento de absorbancia a 340 nm.

## Resultados

Se calcula la actividad del sistema β-oxidación como nmoles de NAD reducidos/minuto/mg de proteína, resultado equivalente a nmoles de acetil-CoA formado/min/mg de proteína, dado que la estequiometría de la reacción es 1:1 entre NADH y acetil-CoA.

Para los cálculos se utiliza un coeficiente de extinción de 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A partir del incremento de absorbancia por minuto, y aplicando la ley de Beer y los factores de transformación necesarios se llega a la fórmula:

$$\frac{A/\text{min}}{6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \cdot \frac{10^6 \text{ nmol}}{1 \text{ mmol}} \cdot \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1}{\text{mg/ml}} = \text{nmol/min/mg}$$

### 2.1.2. NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa (EC 1.6.2.2)

#### Fundamento

El método de Strittmatter (1967), se basa en la utilización de ferricianuro potásico como aceptor artificial de los electrones vehiculizados desde el NADH a través de la NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa. Se monitoriza la oxidación del NADH a 420 nm.

## Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón fosfato potásico pH 7.4	0.1 M	cantidad suf. para 1 ml	0.1 M
$K_3Fe(CN)_6$ (Probus)	5 mM	50 $\mu$ l	250 $\mu$ M
NADH (Boehringer Mannheim)	3 mM	50 $\mu$ l	150 $\mu$ M

## Metódica

En una cubeta se adicionan los volúmenes de reactivos indicados (excepto NADH) junto con el volumen de suspensión microsomal necesario, se agita y se mantiene durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se le añade NADH y se registra la oxidación del mismo a 420 nm, frente al aire.

## Resultados

La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción del ferricianuro,  $1.02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , y se expresa finalmente en nmol/minuto/mg de proteína.

### 2.1.3. NADH citocromo c reductasa

#### Fundamento

Con el método de Yasukochi y Masters (1976) no se mide una sola actividad enzimática, sino el flujo de electrones del NADH a la NADH citocromo  $b_5$  reductasa, de ésta al citocromo  $b_5$  y finalmente al aceptor artificial citocromo c. Se determina la tasa de reducción de éste último a 550 nm.

#### Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón fosfato potásico, pH 7.4	0.1 M	cantidad suf. para 1 ml	0.1 M
KCN (Panreac)	10 mM	30 $\mu$ l	300 $\mu$ M
Citocromo c (Sigma)	1.6 mM	30 $\mu$ l	480 $\mu$ M
EDTA (Merck)	1 mM	100 $\mu$ l	100 $\mu$ M
NADH	3 mM	40 $\mu$ l	120 $\mu$ M

#### Metódica

En una cubeta de espectrofotómetro se adicionan todos los reactivos, excepto el NADH, junto con el volumen necesario de suspensión microsomal, se agita y se preincuba durante 2 minutos a 37° C. La reacción se inicia añadiendo el NADH, y se mide el incremento de absorbancia (frente al aire) que tiene lugar a 550 nm.

## **Resultados**

La actividad enzimática se expresa en nmoles /min/mg de proteína utilizando un coeficiente de extinción de  $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.1.4. NADPH citocromo c reductasa (EC 1.6.2.4)**

#### **Fundamento**

Los electrones procedentes del NADPH son vehiculizados a la NADPH citocromo P450 reductasa, también llamada NADPH citocromo c reductasa y reducen el citocromo c, que actúa como aceptor artificial, ya que el aceptor natural de esta cadena de transporte electrónico es el citocromo P450.

#### **Metódica**

La actividad NADPH citocromo c reductasa se determina también por el método de Yasukochi y Masters (1976), pero utilizando NADPH en vez de NADH.

### **2.1.5. Palmitoil-CoA hidrolasa (EC 3.2.2.1)**

#### **Fundamento**

El método descrito por Berge y col. (1979) se basa en la reacción entre el CoASH liberado por acción del enzima y el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). Este es reducido a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, produciéndose un incremento de la absorbancia a 420 nm.

## Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Hepes (Sigma) + EDTA (Merck) pH 7.4	30 mM 1 mM	cantidad suf. para 1 ml	30 mM 1 mM
BSA libre de ácidos grasos (Sigma)	8 mg/ml	40 µl	0.32 mg/ml
DTNB (Boehringer Mannheim)	6 mM	50 µl	300 µM
Palmitoil-CoA (Sigma)	1 mM	40 µl	40 µM

## Metódica

En una cubeta de espectrofotómetro se adiciona el tampón de la reacción junto con la solución de BSA y el volumen necesario de suspensión proteica (microsomos, mitocondrias o citosol). Se agita, se preincuba 2 minutos a 35° C, y se añaden los 50 µl de solución de DTNB. Se determina durante 1-2 minutos el incremento de absorbancia a 412 nm, frente al aire ( $\Delta A_1$ ), que será debido a la reacción no específica de otros grupos sulfhidril con el DTNB. Seguidamente se añade el sustrato del enzima (palmitoil-CoA), y vuelve a medirse el incremento de absorbancia ( $\Delta A_2$ ) de la misma manera.

## Resultados

La actividad del enzima sobre el sustrato se obtiene a partir de la resta de los incrementos de absorbancia ( $\Delta A_2 - \Delta A_1$ ), aplicando un coeficiente de absorción de  $1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados se expresan en nmol/minuto/mg de proteína.



### 2.1.6. Palmitoil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.3)

#### Fundamento

La palmitoil-CoA sintetasa cataliza la siguiente reacción:



El método utilizado (Tanaka y col., 1981) se basa en la reacción del DTNB con los grupos sulfhidril libres del CoA, que puede medirse por el incremento de absorbancia que se produce a 412 nm. Conociendo la cantidad inicial de CoA (absorbancia en el minuto 0) y la que queda después de tener lugar la reacción (absorbancia final) puede determinarse la actividad enzimática.

#### Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Tris-HCl (Sigma) pH 8.0	0.1 M	cantidad suf. para 0.5 ml	0.1 M
MgCl <sub>2</sub> (Panreac)	300 mM	25 µl	15 mM
KCl (Panreac)	3 M	25 µl	150 mM
Palmitato potásico (*)	20 mM	25 µl	1 mM
CoA (Sigma)	20 mM	25 µl	1 mM
ATP (Boehringer M.)	200 mM	25 µl	10 mM
TCA (Panreac)	105 %	25 µl	

(\*) El palmitato potásico se ha preparado a partir de ácido palmítico (FEROSA) de la siguiente manera: 5.6 mg de ácido palmítico se disuelven en 1 ml de Tritón X-100 30 mM, y para formar la sal se añaden 20 µl de KOH 5 N. Se lleva al ultrasonidos hasta total disolución.

## **Metódica**

En los tubos de reacción (dos por muestra de microsomas), en baño de hielo, se añade el tampón de la reacción juntamente con los volúmenes indicados de las soluciones de  $MgCl_2$ , KCl y palmitato potásico y la cantidad necesaria de suspensión microsomal. Se preincuban los tubos en un baño de agitación a  $37^\circ C$  durante 2 minutos, se añade CoA y ATP y se incuba 5 minutos más. La reacción se termina añadiendo TCA al 105 %, que deberá ser totalmente homogéneo. Para determinar el CoA total, se preparan unos tubos a los que se añadirá el TCA en el minuto 0 de incubación, antes del CoA y el ATP; de esta manera, la absorbancia de estas muestras (absorbancia en el tiempo 0), corresponde a la cantidad de CoA que se ha adicionado.

A continuación se centrifugan los tubos a 10000 rpm durante 10 minutos, se extrae el sobrenadante, donde estará el CoA que no ha reaccionado, y se toman 0.1 ml por duplicado, en tubos de vidrio. Los blancos espectrofotométricos se preparan tomando 0.1 ml, por duplicado, de una mezcla de 25  $\mu l$  de tampón fosfato 1 mM pH 6.3, 25  $\mu l$  de TCA al 105 % y 450  $\mu l$  de tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. A cada tubo se le añaden 0.9 ml de una solución de DTNB 2 mM, y transcurridos 10 minutos se lee la absorbancia frente a los blancos a 412 nm.

## **Resultados**

La actividad enzimática se expresa en nmoles de palmitoil-CoA formados/minuto/mg de proteína, y se calcula a partir de la diferencia entre la absorbancia en el tiempo 0 y la absorbancia problema, aplicando un coeficiente de absorción de  $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.1.7. Succinato deshidrogenasa

### Fundamento

La actividad succinato deshidrogenasa constituye un indicativo de la presencia de mitocondrias o de partículas sub-mitocondriales (Earl y Korner, 1965). Para determinar esta actividad enzimática se ha seguido el método de Green y col. (1955), modificado por Earl y Korner (1965), que consiste en monitorizar la oxidación del succinato por el diclorofenolindofenol espectrofotométricamente a 600 nm.

### Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón fosfato pH 7.6	50 mM	cantidad suf. para 1 ml	50 mM
KCN (Panreac)	20 mM	50 µl	1 mM
2,4-diclorofenol indofenol(Sigma)	4 mM	10 µl	40 µM
Succinato sódico (Sigma)	0.66 M	50 µl	33 mM

### Metodología

En la cubeta cromatográfica se colocan los reactivos (tampón fosfato, KCN, 2,4-diclorofenolindofenol y succinato sódico) y se incuba a 37° C durante 5 minutos. La reacción se inicia con la adición de cantidad suficiente de la suspensión proteica cuya actividad se desea valorar. Se registra la disminución de la absorbancia a 600 nm, realizando la lectura frente a otra

cubeta que contiene todos los reactivos excepto succinato.

## Resultados

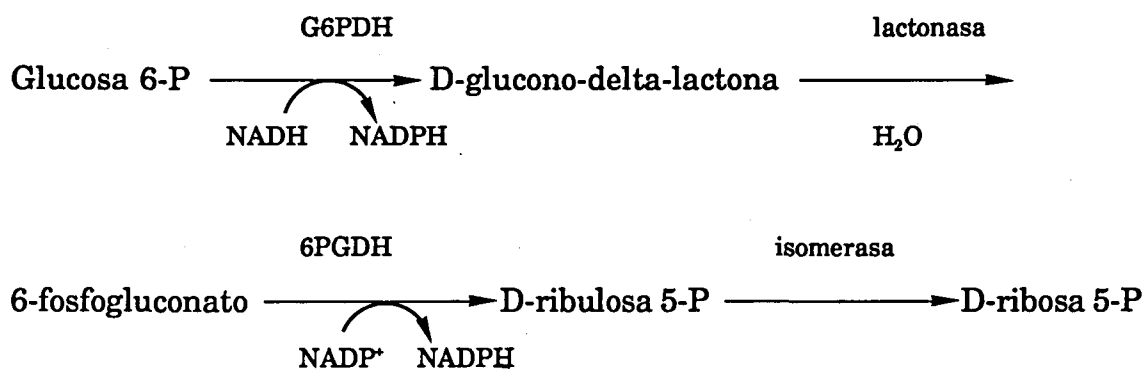
Los resultados se expresan como nmoles de indofenol reducido/min/mg de proteína, utilizando un coeficiente de extinción de  $19.1 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### 2.1.8. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)

#### Fundamento

El método utilizado para la determinación de la actividad glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), es el de Glock y McLean (1953), que se basa en la

siguiente secuencia de reacciones de la ruta de los fosfatos de pentosa:



Resulta difícil determinar únicamente la primera etapa, pues la reacción catalizada por la lactonasa es tan rápida que en algunos casos puede formarse una segunda molécula de NADPH debido a la acción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). Si se utiliza 6PGDH en exceso, se consigue desplazar la ruta de los fosfatos de pentosa totalmente hacia la

derecha, con lo cual será segura la formación de dos moléculas de NADPH, y podrá calcularse la actividad G6PDH como la mitad de la actividad total.

### Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Tris-HCl (Sigma) pH 7.4	0.16 M	cantidad suf. para 1 ml	0.16 M
MgCl <sub>2</sub>	30 mM	50 µl	1.5 mM
6PGDH (Sigma)		9 µl	
NADP <sup>+</sup> (Sigma)	1.2 mM	50 µl	60 µM
Glucosa 6-fosfato (Sigma)	3.3 mM	50 µl	165 µM

Dado que la 6PGDH se presenta comercialmente en forma de suspensión en sulfato amónico, y este inhibía en un 10 % la actividad G6PDH, antes de ser utilizada se eluía por una columna de Sephadex G-25 para eliminarlo.

### Metodología

En cada cubeta se adicionan los volúmenes correspondientes de tampón, MgCl<sub>2</sub> y 6PGDH, junto con citosol en cantidad suficiente para una concentración de 300 µg/ml. Se agita y, después de mantenerla 5 minutos en preincubación a 30° C, se añade el NADP<sup>+</sup>. La reacción se inicia entonces añadiendo la glucosa 6-fosfato y se mide el incremento de absorbancia a 340 nm. Los blancos se realizaron en idénticas condiciones pero en ausencia de glucosa 6-fosfato.

## Resultados

La actividad enzimática total se calcula a partir del incremento de absorbancia por minuto, utilizando un coeficiente de absorción de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , y se expresa en  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína citosólica. La actividad de la G6PDH será la mitad de la total.

## **2.2. METODOS RADIATIVOS**

### **2.2.1. Elongación exógena**

El término elongación exógena se utiliza para designar la actividad elongasa tomando como substratos ésteres CoA de ácidos grasos adicionados al medio de incubación, diferenciándola de la elongación endógena, en que se utilizan como substratos los propios ácidos grasos presentes en la membrana microsomal.

La actividad elongasa se ha determinado con tres tipos de substratos: saturado (palmitoil-CoA), monoinsaturado (palmitoleoil-CoA) y poliinsaturado (gamma-linolenil-CoA). Dado que el gamma-linolenil-CoA no está disponible comercialmente, se ha procedido a su síntesis tal como se expone en el siguiente apartado.

#### **2.2.1.1. Síntesis de gamma-linolenil-CoA**

Para la síntesis se ha seguido el método de Fong y Schulz (1981), y el producto obtenido se ha purificado según el método de Al-Arif y Blecher (1969).

0.1 mmoles de ácido gamma-linolénico (Sigma) se disuelven en 1 ml de tetrahidrofurano (Panreac) recién destilado sobre  $\text{LiAlH}_4$ . Se añaden 0.1 mmoles de trietilamina (Merck) y 0.1 mmoles de etilcloroformiato (Fluka), se mezcla y se deja reaccionar durante 10 minutos. La solución se filtra rápidamente a través de una pipeta pasteur con lana de vidrio y se añade gota a gota, mediante una columna, a una solución que consta de 0.02 mmoles de coenzima A (Sigma) y 20 mg de  $\text{NaHCO}_3$  en 1.5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

La reacción se mantiene en atmósfera inerte con  $\text{N}_2$  y en agitación. Una

vez añadido todo el ácido graso, si la solución no queda clara se añade tetrahidrofurano hasta clarificarla.

Durante todo el proceso de reacción se van cogiendo alícuotas de la mezcla de reacción y se les añade igual volumen de solución de DTNB (4 mg/ml tampón fosfato 0.1 M pH 8.0) y 1 ml de tampón. La reacción ha finalizado cuando ya no se observa color amarillo (formado al reaccionar el DTNB con el coenzima A libre).

A continuación se acidifica con HCl 5 N para producir la precipitación de acil-CoAs, ácidos grasos y CoA libre. Los ácidos grasos libres se extraen con hexano, se elimina la fase acuosa y la fase de hexano, y se lava el precipitado, primero con hexano, para eliminar cualquier resto de ácido libre, y luego con acetona, para secarlo bajo corriente de N<sub>2</sub>. Finalmente, se añade tampón fosfato 20 mM pH 8.0, y se ajusta el pH a 5-6 con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>.

Si la solución no queda clara, se acidifica con HClO<sub>4</sub> al 5 %, se centrifuga y se vuelve a intentar la disolución. Como última solución, se puede descartar el precipitado no disuelto después de ajustar el pH a 5-6.

Para comprobar que realmente se ha obtenido gamma-linolenil-CoA, se realizó una cromatografía en capa fina antes y después de la hidrólisis del mismo. Para ello se utilizaron placas de silica gel-G y éter de petróleo/éter etílico/ácido fórmico (75/25/1, v/v/v) como sistema de elución. Pudo comprobarse que antes de la hidrólisis aparecía únicamente una mancha correspondiente al derivado acil-CoA, mientras que después de la hidrólisis aparecía una mancha correspondiente al ácido gamma-linolénico y otra correspondiente al CoA.

Finalmente, se calculó la concentración del gamma-linolenil-CoA sintetizado por el método de Ellman.



## **2.2.1.2. Determinación de la concentración de acil-CoA sintetizado: método de Ellman**

### **Fundamento**

El método de Ellman (1959) se basa en romper los enlaces tioéster que se han formado entre el ácido graso y el coenzima A mediante la hidroxilamina, determinando el coenzima A liberado por lectura al espectrofotómetro de la coloración amarilla formada al reaccionar los grupos sulfhidrilo libres con el DTNB.

### **Metódica**

A 50  $\mu$ l de gamma-linolenil-CoA se adiciona el mismo volumen de hidroxilamina 2 M (en H<sub>2</sub>O bidestilada y llevada a pH 7 con KOH 5 M). Se deja reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente y se añaden 10  $\mu$ l de DTNB 10 M (disuelto en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 8.0). Se espera 30 segundos antes de añadir 300  $\mu$ l del mismo tampón fosfato y 590  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada, se agita y se lee la absorbancia a 412 nm. Con este ensayo se determina el coenzima A total, tanto el que estaba formando parte del derivado acil-CoA como el libre.

El mismo ensayo en ausencia de hidroxilamina sirve para determinar el coenzima A libre (que no resultó ser superior al 5 % en ningún caso). Todos los ensayos se realizaron por triplicado frente al blanco, que se obtiene omitiendo el gamma-linolenil-CoA.

### **Resultados**

La concentración de acil-CoA sintetizado se obtiene de la diferencia entre el coenzima A total y el libre; la concentración de éstos se calcula a partir de la ley de Beer, mediante la siguiente transformación:

$$\text{Concnetraci6m (mM)} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}}}{13.6 \cdot 0.05}$$

### 2.2.1.3. Determinaci6n de la actividad elongasa ex6gena

#### Fundamento

Para determinar la actividad elongasa se ha seguido el m6todo descrito por Prasad y Cinti (1986), que se basa en la medida de la incorporaci6n de [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA a los acil-CoAs ex6genos adicionados.

#### Reactivos

	Concentraci6n "stock"	Volumen a6nadido	Concentraci6n final
Tamp6n Tris-HCl pH 7.4	100 mM	cantidad suf. para 0.5 ml	100 mM
BSA libre de 6c. grasos (Sigma)	200 μM	50 μl	20 μM
NADPH (Sigma)	5 mM	50 μl	500 μM
Palmitoil-, palmitoleoil- y gamma-linolenil-CoA (*)	1 mM	20 μl	40 μM
Malonil-CoA	0.25 mM 1 mM	50 μl 17.5 μl	60 μM

(\*) El gamma-linolenil-CoA no puede conseguirse comercialmente, y ha sido sintetizado tal como se expone en el apartado 2.2.1.1. Palmitoil- y palmitoleoil-CoA proceden de Sigma.

## **Metódica**

En tubos de vidrio de rosca se mezclan el tampón Tris junto con BSA, NADPH y el acil-CoA correspondiente según los volúmenes indicados. Se adiciona la suspensión microsomal a la concentración adecuada y se preincuban los tubos en un baño de agitación a 37° C durante 2 minutos.

La reacción se inicia adicionando malonil-CoA a una concentración final de 60  $\mu$ M, que contiene entre 40000 y 50000 cpm de [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA (49 mCi/mmol, Amersham), según Suneja y col., 1990. Se incuba a 37° C durante 5 minutos y se para la reacción añadiendo 0.5 ml de KOH al 15 % en metanol. Los blancos se realizan en idénticas condiciones pero añadiendo primero la potasa y después el malonil-CoA. Seguidamente se saponifica a 70° C durante 45 minutos, se acidifica con 0.5 ml de HCl 0.5 N, y se extraen los ácidos grasos libres con 3 x 2 ml de hexano.

Las fracciones de hexano se recogen en viales de centelleo, se secan bajo corriente de aire y se añade 7 ml de líquido de centelleo (Scharlau Co 136). La radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1800.

Para evitar fenómenos de luminiscencia, la extracción se realizó en la penumbra y los viales se dejaron reposar en la oscuridad durante 45 minutos antes de realizar el contaje.

## **Resultados**

La actividad enzimática se expresa en nmoles de malonil-CoA/minuto/mg de proteína, y se calcula a partir de la radioactividad incorporada mediante la siguiente transformación:

CPM (muestra) - CPM (blanco)	60 nmoles
CPM (adicionadas) - CPM (blanco)	mg prot . 5 min

### **2.2.2. Sistemas de desaturación de ácidos grasos: delta-9, -6 y -5 desaturasas (E.C. 1.14.99.5)**

Los microsomas hepáticos contienen al menos tres sistemas de desaturación de ácidos grasos que introducen dobles enlaces en las posiciones n-9 (delta-9 desaturasa), n-6 (delta-6 desaturasa) y n-5 (delta-5 desaturasa). Para determinar éstas actividades enzimáticas se han utilizado como substratos de las mismas ácidos grasos (delta-5 y delta-6) o sus correspondientes derivados CoA (delta-9) marcados radiactivamente, y luego se ha determinado la radiactividad incorporada en el producto desaturado. El substrato radiactivo de la delta-9 desaturasa, [1-<sup>14</sup>C] estearoil-CoA, se sintetizó en nuestro laboratorio, tal como se describe en la sección 2.2.2.1.

Para separar substrato y producto, se han utilizado técnicas de cromatografía en capa fina en placas de silica gel impregnadas de AgNO<sub>3</sub> al 20 %. Las sales de plata forman complejos con los compuestos orgánicos insaturados. La plata actúa como aceptor de electrones, mientras que el compuesto insaturado actúa como donador (Christie, 1992). Esta propiedad permite separar los ácidos grasos de acuerdo con el número de insaturaciones: el producto de la reacción, más insaturado que el substrato, quedará más retenido. Para utilizar este método es necesario transformar los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos, utilizando una solución de diazometano en éter etílico, que se prepara tal como se describe (Sección 2.2.2.2.).

#### **2.2.2.1. Síntesis de [1-<sup>14</sup>C] estearoil-CoA**

La síntesis se ha realizado de forma similar a como se ha descrito en el apartado 2.2.1.1. La diferencia es que en el caso de los derivados CoA no

radiactivos, el ácido está en exceso respecto al coenzima A (proporción 5:1); en este caso, en cambio, para conseguir la máxima incorporación de cpm se puso en exceso el coenzima A respecto al ácido (proporción 1:2.5). Utilizando ésta proporción el rendimiento es más bajo (25-30 %), pero se consigue una incorporación máxima de cpm del 60-70 %.

0.01 mmol de ácido esteárico (Sigma) y 25  $\mu$ Ci de ácido [1- $^{14}$ C] esteárico (New England Nuclear) se disuelven en 100  $\mu$ l de tetrahidrofurano recién destilado sobre  $\text{LiAlH}_4$ , y se añaden 0.01 mmoles de trietilamina y 0.01 mmoles de etilcloroformiato. Se mezcla y se deja reaccionar durante 10 minutos.

La solución se filtra rápidamente a través de una pipeta pasteur con lana de vidrio y se añade gota a gota a una solución que consta de 0.025 mmoles de coenzima A, 1.87 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , 1.25 ml de tetrahidrofurano y 25 mg de  $\text{NaHCO}_3$ . La solución se mantiene en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  y con agitación. Si una vez añadido todo el ácido graso la solución no queda clara, se añade más tetrahidrofurano hasta clarificarla. Durante todo el proceso de reacción se van cogiendo alícuotas de la mezcla de reacción y se les añade igual volumen de solución de DTNB (4 mg/ml tampón fosfato 0.1 M pH 8.0) y 1 ml de tampón. La reacción ha finalizado cuando ya no se observa color amarillo (formado al reaccionar el DTNB con el coenzima A libre). El tiempo óptimo de reacción es de 1h 30 min.

Una vez finalizada la reacción y precipitados los ácidos grasos libres y los acil-CoAs con  $\text{HCl}$  5 N, se procedió a la extracción de los ácidos grasos libres con tres volúmenes de 3 ml de hexano. Posteriormente, se lavó el precipitado, primero con hexano, y luego con acetona, se secó bajo corriente de  $\text{N}_2$ , y se resuspendió en tampón y se ajustó el pH tal como se ha descrito en el apartado 2.2.1.1.

Las fracciones de hexano se recogieron en viales de centelleo, se

evaporaron a sequedad y se contaron en un contador de centelleo líquido. Lo mismo se hizo con la fracción acuosa descartada, y con una alícuota de la solución de estearoil-CoA obtenida. De este modo se calcularon el número de cpm recuperadas y la proporción de cpm incorporadas.

Para comprobar la pureza del acil-CoA obtenido se utilizaron técnicas de cromatografía en capa fina:

- en placas de silica gel G desarrolladas con n-butanol/ácido acético/agua 50:30:20 (v/v/v), utilizando como patrones estearoil-CoA frío, coenzima A y ácido esteárico y revelando con diclorofluoresceína. Se rasca la mancha correspondiente al patrón de acil-CoA y al resto de manchas y se cuenta la radiactividad asociada a cada una de ellas, así como la radiactividad asociada a la placa de manera inespecífica.

- en placas de silica gel G impregnadas con  $\text{AgNO}_3$  al 20 % desarrolladas en hexano/éter dietílico 90:10 (v/v) y revelando con diclorofluoresceína. En este sistema se detecta el ácido esteárico libre. Por tanto, hay que hacer un ensayo con el estearoil-CoA obtenido, que nos indicaría la cantidad de esteárico libre que contiene la muestra sintetizada, y otro ensayo previa saponificación que liberaría el ácido graso que estuviera formando parte del derivado CoA. La diferencia entre los dos valores indica, de las cpm adicionadas, cuántas corresponden al acil-CoA y cuántas al ácido graso libre.

La pureza de la muestra no fue nunca inferior al 85 %, en ningún caso se observó contaminación con coenzima A, y la cantidad de ácido graso libre presente en la muestra no superó el 15 %.

La concentración del estearoil-CoA sintetizado se determinó por el método de Ellman, que se describe en el apartado 2.2.1.2.

### **2.2.2.2. Preparación de la solución de diazometano en éter etílico**

En un matraz kitasato se disuelve aproximadamente 1 g de N-metil-N-nitroso-p-tolueno-sulfonamida en 25 ml de éter etílico, y se calienta hasta una temperatura de 35° C. Al llegar a esta temperatura, se adiciona KOH al 15 % en metanol hasta que comienza la formación de gas. En ese instante se tapa el matraz, que va acoplado a un tubo de goma, de modo que el gas borbotee sobre éter etílico hasta que éste se adopte un color amarillo intenso.

Dado que el diazometano puede ser explosivo, se tomaron una serie de precauciones. Así, la reacción se realizó bajo campana de aire y se evitó que la temperatura subiera por encima de 35° C. El recipiente de preparación no presentaba aristas de vidrio y se utilizaron juntas de goma. La adición de potasa debe pararse en el momento en que se inicia la formación de gas, pues si ésta es excesiva puede originarse un exceso de presión y ocasionar accidentes.

### **2.2.2.3. Determinación de la actividad Delta-9 desaturasa**

#### **Fundamento**

La actividad delta-9 desaturasa se determinó según el método de Laguna y col. (1989), que se basa en medir la radiactividad incorporada en el producto de la desaturación respecto a la radiactividad total (substrato + producto). La separación de substrato y producto se realiza por cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílica gel impregnadas de  $\text{AgNO}_3$  al 20 %.

## Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Tris-HCl pH 7.4	100 mM	cantidad suf. para 0.5 ml	100 mM
Estearoil-CoA (Sigma)	1 mM	(*)	15 $\mu$ M
NADH (Sigma)	10 mM	25 $\mu$ l	0.5 mM

(\*) El volumen de estearoil-CoA, se calcula teniendo en cuenta el volumen de [1-<sup>14</sup>C] estearoil-CoA que debe añadirse para tener 37500 cpm, y por tanto, variará según la concentración del sustrato radiactivo que se haya sintetizado.

## Metódica

En tubos de vidrio con tapón de rosca se mezcla el tampón Tris junto con NADH y cantidad suficiente de suspensión microsomal recién obtenida. Después de 2 minutos de preincubación en un baño de agitación a 37° C, se inicia la reacción con la adición de estearoil-CoA (conteniendo 37500 cpm de [1-<sup>14</sup>C] estearoil-CoA) de modo que la concentración final sea de 15  $\mu$ M. Se incuba durante 5 minutos a 37° C y se para la reacción añadiendo 500  $\mu$ l de KOH al 15 % en metanol (conteniendo 0.015 mg BHT (Fluka)/ml). Los blancos se realizan de igual manera, pero añadiendo la potasa antes que el sustrato de la reacción. A continuación se añade a cada tubo 50  $\mu$ l de una solución etanólica que contiene 150  $\mu$ g de ácido esteárico (Sigma) y 150  $\mu$ g de ácido oleico (Sigma) como patrones cromatográficos (conteniendo 0.015 mg BHT/ml).

Se saponifican los lípidos durante 45 minutos a 70° C y después se acidifica el medio con 500  $\mu$ l de HCL 5 N. Los ácidos grasos libres se extraen con tres fracciones de 2 ml de hexano (conteniendo 0.015 mg BHT/ml). Las fracciones reunidas de hexano se recogen en tubos de vidrio cónicos y se



evaporan a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>.

En este proceso se recuperan tanto el producto formado como el sustrato que no ha reaccionado. Para separarlos, se utiliza una técnica de cromatografía en capa fina, pero previamente deben formarse los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Para ello se adiciona a cada tubo 100 µl de una solución de diazometano en éter etílico (sección 2.2.2.1.). El color amarillo debe permanecer después de agitar durante diez segundos. El éter se evapora bajo corriente de N<sub>2</sub>, se redisuelve la muestra en cloroformo (2 x 50 µl) y se siembra en placas de sílica gel al 20 % de AgNO<sub>3</sub> previamente activadas a 95-100° C durante 30 minutos. El sistema solvente utilizado fue hexano/éter dietílico 90:10 (v/v).

La placa se revela rociándola con una solución etanólica de diclorofluoresceína al 0.2 % y, después de secarla a la estufa durante dos minutos, se visualizan las manchas a la luz ultravioleta.

Se rasca la sílica correspondiente a las zonas de la placa donde están localizados el sustrato y el producto y se coloca directamente en viales de centelleo. Se adicionan 7 ml de líquido de contaje totalmente anhidro (Scharlau Co 36), para evitar la precipitación de los compuestos de plata y se cuenta la radiactividad, después de 45 minutos de reposo en la oscuridad, en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1800.

## **Resultados**

La actividad delta-9 desturasa se expresa en nmol de ácido oleico formado/min/mg de proteína. Se calcula dividiendo la radiactividad hallada en el producto insaturado (oleico) por la suma de las radiactividades halladas en el producto y en el sustrato:

$$\left( \frac{\text{CPM}_{\text{oleico}}}{\text{CPM}_{\text{oleico}} + \text{CPM}_{\text{esteárico}}} \right)_{\text{muestra}} - \left( \frac{\text{CPM}_{\text{oleico}}}{\text{CPM}_{\text{oleico}} + \text{CPM}_{\text{esteárico}}} \right)_{\text{blanco}} \cdot \frac{15 \text{ nmol}}{5 \text{ min. mg prot/ml}}$$

#### 2.2.2.4. Determinación de la actividad Delta-6 desaturasa

##### Fundamento

La actividad delta-6 desaturasa se determinó por una modificación de los métodos descritos por Leikin y Brenner (1989), Mahfouz y Kummerow (1989) y Kawashima y col. (1990). La actividad enzimática se valoró utilizando como sustrato el ácido linoleico (18:2 n-6) conteniendo una cierta proporción del mismo ácido marcado radiactivamente. En presencia de CoA, MgCl<sub>2</sub> y ATP los microsomas son capaces de sintetizar el correspondiente derivado CoA, y desaturarlo a gamma-linolenil-CoA. En esta técnica se mide la radiactividad asociada al producto respecto la radiactividad total, separando sustrato y producto por cromatografía en capa fina.

## Reactivos

	Concentración "stock"	Volumen añadido	Concentración final
Tampón Tris-HCl pH 7.4	100 mM	Cantidad suf. para 0.5 ml	100 mM
GSH (Sigma)	30 mM	25 $\mu$ l	1.5 mM
MgCl <sub>2</sub> (Panreac)	100 mM	37.5 $\mu$ l	7.5 mM
ATP (Sigma) (ajustado a pH 7.0 con 75 $\mu$ l de KOH 5 N/ml solución)	200 mM	13.44 $\mu$ l	5 mM
Coenzima A (Sigma)	4 mM	25 $\mu$ l	200 $\mu$ M
NADH (Sigma)	10 mM	25 $\mu$ l	500 $\mu$ M
Acido linoleico (Sigma)	2.5 mM	5 $\mu$ l	25 $\mu$ M

## Metodología

En tubos de vidrio con tapón de rosca se colocan el tampón Tris junto con los volúmenes indicados de GSH, MgCl<sub>2</sub>, ATP, CoA, NADH, y cantidad suficiente de proteína microsomal recién obtenida. En este caso se adiciona también proteína citosólica (proporción 250  $\mu$ g citosol/mg microsomas, según Sánchez y col., 1993), puesto que es necesario para que el sistema de desaturación llegue a su máxima actividad (Leikin y Brenner, 1989).

Después de 2 minutos de preincubación en un baño de agitación a 37° C, se inicia la reacción añadiendo ácido linoleico (conteniendo 0.05  $\mu$ Ci de ácido [1-<sup>14</sup>C] linoleico (New England Nuclear, 50 mCi/mmol)) hasta una concentración final en el medio de 25  $\mu$ M. El substrato se adiciona en forma

de solución etanólica, de manera que el contenido en etanol no sea superior al 1 % respecto al volumen de reacción. Tras un tiempo de incubación de 10 minutos, se para la reacción con KOH al 15 % en metanol (conteniendo 0.015 mg BHT/ml). Los blancos se hacen añadiendo la potasa antes que el sustrato. A cada tubo se le añaden 50 µl de una solución etanólica que contiene 150 µg de ácido linoleico (Sigma) y 150 µg de ácido gamma-linolénico (Sigma) y 0.015 mg BHT/ml. A partir de aquí se sigue como en el caso de la delta-9 desaturasa, salvo que el sistema de solventes utilizado para desarrollar la capa fina fue éter etílico/éter de petróleo 1:1 (v/v).

## Resultados

Los resultados se expresan en nmol de ácido gamma-linolénico formado/min/mg de proteína. Se calcula a partir de la relación entre la radiactividad incorporada en el producto (ácido gamma-linolénico) y la radiactividad total (sustrato + producto):

$$\left( \frac{\text{CPM}_{g\text{-linol.}}}{\text{CPM}_{\text{linol.}} + \text{CPM}_{g\text{-linol.}}} \right)_{\text{muestra}} - \left( \frac{\text{CPM}_{g\text{-linol.}}}{\text{CPM}_{\text{linol.}} + \text{CPM}_{g\text{-linol.}}} \right)_{\text{blanco}} \cdot \frac{25 \text{ nmol}}{10 \text{ min.mg prot/ml}}$$

### 2.2.2.5. Determinación de la actividad Delta-5 desaturasa

La actividad delta-5 desaturasa se valora de igual modo que la delta-6, con algunas diferencias. En este caso, el sustrato de la reacción es el ácido 8,11,14 eicosatrienoico o dihomo-gamma-linolénico, que se adiciona a la mezcla en preincubación de modo que la concentración final sea el doble que

en el caso de la delta-6, es decir, 50 mM. El sustrato se adiciona en forma de solución etanólica conteniendo 0.05  $\mu\text{Ci}$  de ácido  $[1-^{14}\text{C}]$  dihomo-gamma-linolénico (New England Nuclear, 47 mCi/mmol). El tiempo de incubación se reduce a 5 minutos. Como patrón cromatográfico se usa una solución etanólica que contiene 3 mg/ml de ácido dihomo-gamma-linolénico (Sigma) y de ácido araquidónico (Sigma), de la cual se añaden 60  $\mu\text{l}$  a cada tubo. El resto de la técnica, incluyendo el sistema de solventes para el desarrollo de la cromatografía en capa fina, es idéntica a la expuesta para la delta-6 desaturasa.

Los resultados se expresan en nmoles de ácido araquidónico formado/min/mg de proteína, según la fórmula:

$$\left( \frac{\text{CPM}_{\text{araq.}}}{\text{CPM}_{\text{araq.}} + \text{CPM}_{\text{di-g.linol.}}} \right)_{\text{muestra}} - \left( \frac{\text{CPM}_{\text{araq.}}}{\text{CPM}_{\text{araq.}} + \text{CPM}_{\text{di-g.linol.}}} \right)_{\text{blanco}} \cdot \frac{50 \text{ nmol}}{5 \text{ min.mg prot/ml}}$$

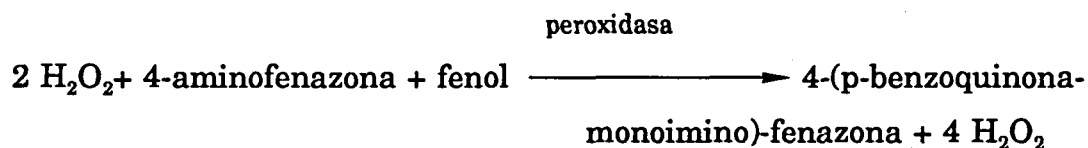
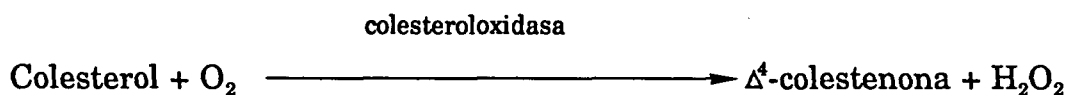
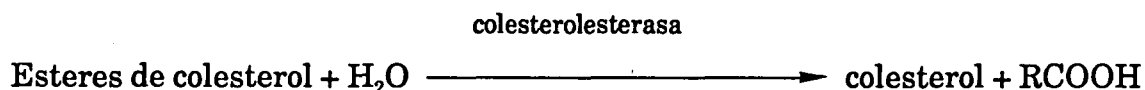
### 3. PARAMETROS PLASMATICOS

#### 3.1. Colesterol plasmático

Para la determinación de la concentración de colesterol de las muestras de plasma obtenidas, se ha utilizado un test colorimétrico (Monotest Colesterol - método CHODPAP nº 290319, Boehringer Mannheim).

#### Fundamento

El método se basa en la valoración indirecta del colesterol procedente de la hidrólisis enzimática de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa. El colesterol formado es oxidado entonces por la colesterol oxidasa, produciéndose  $H_2O_2$ . Esta reacciona con 4-aminofenazona y fenol, dando lugar, por acción de una peroxidasa, a la formación de 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona, que es el compuesto que se detecta coloriméricamente. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



#### Reactivos

La solución reactiva presenta la siguiente composición en el medio de reacción:

	Concentración final
Tampón Tris pH 7.7	100 mM
Aspartato magnésico	50 mM
4-aminofenazona	1 mM
Colato sódico	10 mM
Fenol	6 mM
3,4-diclorofenol	4 mM
Eter poliglicólico	0.3 %
Colesterolesterasa	≥ 0.4 U/ml
Colesteroolidasa	≥ 0.25 U/ml
Peroxidasa	≥ 0.2 U/ml

### **Metódica**

Se mezclan en la cubeta de reacción 10 µl de plasma con 1 ml de solución reactiva. Se prepara también un blanco con 1 ml de solución reactiva. La muestra se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lee la extinción de la muestra frente al blanco a una longitud de onda de 546 nm con lámpara de Hg en un autoanalizador Chemacomp 90.

### **Resultados**

La concentración de colesterol se expresa en mg/dl, y se calcula a partir de la extinción hallada (E) según la fórmula:

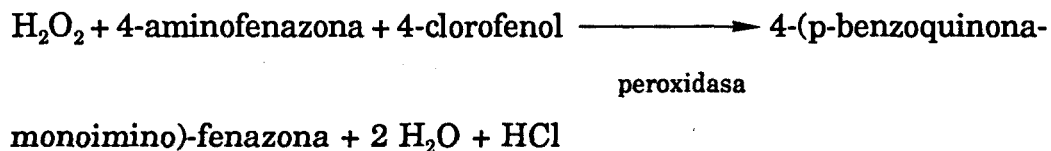
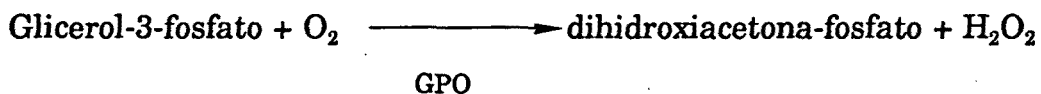
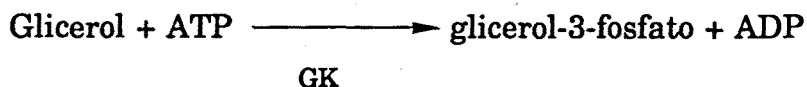
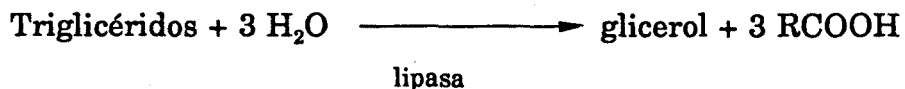
$$c \text{ (mg/dl)} = 853 \cdot E$$

### 3.2. Triglicéridos

Para la determinar la concentración de triglicéridos en el plasma se ha utilizado el test enzimático Peridochrom Triglicéridos GPO-PAP nº 710882, de Boehringer Mannheim.

#### Fundamento

El método se basa en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y la determinación del glicerol formado gracias a una serie de reacciones acopladas:



#### Reactivos

- Solución tampón que contiene, en concentraciones finales:



tampón Tris 0.15 M pH 7.6

sulfato de Mg 17.5 mM

EDTA (sal disódica) 10 mM

4-clorofenol 3.5 mM

colato sódico 0.15 %

ferricianuro potásico 6  $\mu$ M

éter poliglicólico de alcohol graso 0.12 %

- Tiras portarreactivas que contienen ATP  $\geq$  0.5 mM, 4-aminofenazona 0.35 mM, lipasa  $\geq$  3 U/ml, glicerofosfato-oxidasa (GPO)  $\geq$  2.5 U/ml, glicerokinasa (GK)  $\geq$  0.2 U/ml, peroxidasa  $\geq$  0.15 U/ml.

### **Metódica**

Se prepara la solución reactiva sumergiendo una tira portarreactivos en la solución tampón; se agita durante 10 segundos, se mantiene en reposo 5 minutos y vuelve a agitarse. La tira reactiva se descarta.

En un tubo de vidrio se mezclan 10  $\mu$ l de plasma con 1 ml de solución reactiva. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se determina la extinción (E) frente a un blanco realizado con 1 ml de solución reactiva a 546 nm. Para ello se ha utilizado un autoanalizador ChemaComp 90 con lámpara de Hg.

### **Resultados**

La concentración de triglicéridos plasmáticos se expresa en mg/dl y se calcula según la fórmula:

$$c \text{ (mg/dl)} = 200 \cdot (E_{\text{muestra}} / E_{\text{blanco}})$$

Tanto en la determinación del colesterol plasmático como de los triglicéridos, se realiza un control de calidad con Precinorm nº 171735 (Boehringer Mannheim).

#### **4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA**

Existen varias técnicas para la electroforesis vertical con gel de poliacrilamida. El método más conveniente para la detreminación del peso molecular de las proteínas es el de Laemmli (1970), que se basa en la utilización de sodiolaurilsulfato (SDS).

Se necesitan las siguientes soluciones stock:

- Solución A (solución al 30 % de acrilamida): 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de N,N'-metilenbisacrilamida en 100 ml de agua.
- Solución B: tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, conteniendo 0.4 % de SDS.
- Solución C: tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, conteniendo 0.4 % de SDS.
- Solución D: persulfato amónico al 10 %.

Las soluciones A, B y C pueden guardarse en nevera durante un mes, pero la solución D debe prepararse extemporáneamente.

Se utilizó un gel de separación al 10 % y un gel de concentración al 3 %. Las cantidades de cada solución que hay que utilizar para estas concentraciones son:

Sol.	Gel de separación	Gel de concentración
A	6 ml	0.6 ml
B	4.5 ml	-
C	-	1.5 ml
D	70 $\mu$ l	18 $\mu$ l
TMD *	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
agua	7.5 ml	3.6 ml

(\*) TMD: N, N, N', N'- tetrametiletildiamina

Para preparar los geles se mezclan las soluciones A y B (o C) con el agua y, tras desgasificar 10 minutos en kitasato, se añade TMD y la solución D y se agita suavemente. El gel ha de prepararse inmediatamente.

En primer lugar se aplica el gel de separación entre las dos placas de vidrio de la cámara de electroforesis (ATTO Corporation, AE-6200), depositando encima una capa de 1-2 cm de agua y dejándolo polimerizar unas dos horas.

Una vez polimerizado se elimina el agua y se añade el gel de concentración, el cual habrá polimerizado completamente al cabo de 30 minutos.

La muestra se prepara del siguiente modo: a los  $\mu$ l de muestra correspondientes a 200  $\mu$ g de proteína se le añade agua bidestilada hasta 80  $\mu$ l de volumen, y luego 80  $\mu$ l más de tampón Tris 0.125 M, SDS 4 %, Glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0.002 % pH 6.8 (tampón de muestra). De esta manera la muestra queda a una concentración del 0.125 %. Antes de sembrar se lleva a ebullición durante 2 minutos.

Las placas conteniendo el gel se introducen en la cámara de

electroforesis, conjuntamente con 300 ml de tampón Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1 % (tampón de electroforesis) y se siembran 40 µl en cada pocillo de la muestra preparada tal como se ha indicado. Asimismo, se siembran 10 µl de una solución estándar preteñida para SDS-PAGE (Sigma), que contiene 6 proteínas distintas, de pesos moleculares comprendidos entre 25000 y 127000 D. Antes de su siembra, la solución estándar de proteínas debe ser llevada a ebullición durante 1-2 minutos.

La electroforesis se desarrolla a una corriente constante de 50 mA y voltaje variable: 50 voltios cuando la muestra pasa por el gel de concentración, se ajusta a 180 voltios cuando llega al gel de separación, y hasta 350 voltios al final del proceso (1 cm del extremo de la placa).

El gel se sitúa entonces en una cubeta en agitación que contenga líquido de tinción (Coomassie Blue 0.25 %, metanol 50 % y ácido acético 10 %) durante 2-4 horas. Después se pasa al recipiente de destinción, que contiene una solución de isopropanol al 15 % y ácido acético al 10 %. Se deja en agitación, cambiando la solución cada 12 horas, hasta que se destiñe adecuadamente el gel.

## **5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS**

Los datos correspondientes a cada grupo de tratamiento se han analizado por el test de ANOVA de doble vía (en función de las variables tiempo y tratamiento), utilizando el programa informático FOUNDS. Este mismo programa proporciona los contrastes *a posteriori* por el método de Duncan. Se han considerado significativas las diferencias con una  $p < 0.05$ .

Los ajustes lineales entre dos variables se han realizado por regresión lineal (método de los mínimos cuadrados) con la ayuda del programa informático GPIIP.



## **RESULTADOS**



## **1. PARAMETROS NO ENZIMATICOS**

Dado que las actividades enzimáticas determinadas en este trabajo han sido numerosas, y que los ensayos se han realizado en dos especies distintas, y en el caso de la rata, a seis tiempos diferentes, los tratamientos se han desarrollado durante un período de dos años. En cada período de tratamientos se ha procedido diariamente a pesar los animales y a calcular el consumo diario de alimento. Además, en los días de sacrificio se ha determinado el peso del hígado, y se han tomado muestras de sangre para la determinación de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma. Los valores de estos parámetros no enzimáticos y plasmáticos, se han obtenido, pues, en dos años distintos, y se presentan aquí por separado: el período I corresponde a las ratas en las que se ha determinado las actividades correspondientes a las cadenas de transporte electrónico, palmitoil-CoA hidrolasas y la palmitoil-CoA sintetasa; en el período II se han determinado las actividades de elongación y desaturación de ácidos grasos. La actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica se ha determinado en ambos períodos.

### **1.1. Evolución temporal del peso corporal en ratas**

La evolución temporal del peso corporal de las ratas ha sido muy similar en los dos períodos de tratamiento (Tablas 1.1.a y 1.1.b). A lo largo del tiempo, se observa una tendencia de las ratas tratadas con fibratos a sufrir un incremento ponderal menor que las ratas control. Las diferencias empiezan a ser significativas en ambos casos ( $p < 0.05$ ) a partir del día 5 de tratamiento. Aproximadamente, las ratas tratadas pesan casi un 10 % menos que las control en los últimos cuatro días de tratamiento.

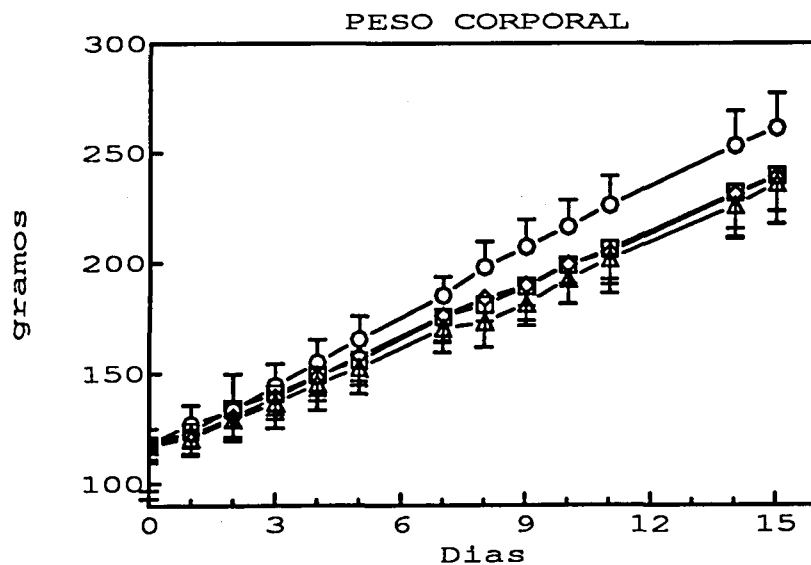


**Tabla 1.1.a. Evolución temporal del peso corporal en ratas (Período I)**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	117.9 ± 6.9	117.3 ± 6.4	117.0 ± 6.9	117.3 ± 7.9
1	126.8 ± 8.6	123.6 ± 7.6	120.7 ± 7.9	122.2 ± 8.6
2	133.2 ± 16.3	133.9 ± 8.0	128.8 ± 9.5	130.2 ± 9.0
3	144.3 ± 10.0	140.7 ± 9.6	136.5 ± 11.5	139.0 ± 9.9
4	154.8 ± 10.4	149.0 ± 9.3	145.2 ± 12.1	148.1 ± 10.7
5	165.3 ± 10.5	155.7 ± 11.3	152.3 ± 11.6	157.8 ± 11.5
7	185.2 ± 8.5	175.4 ± 11.8	170.2 ± 10.9	175.9 ± 11.3
8	198.0 ± 11.6	180.9 ± 7.5	173.1 ± 11.4	183.8 ± 14.4
9	207.2 ± 12.3	189.1 ± 8.7	181.4 ± 9.9	189.7 ± 16.0
10	216.4 ± 12.1	198.8 ± 8.3 *	192.6 ± 11.3*	199.2 ± 17.8*
11	226.2 ± 13.3	206.1 ± 15.9*	201.7 ± 9.2 *	204.5 ± 18.3*
14	253.3 ± 15.9	231.7 ± 16.3*	225.9 ± 14.3*	231.1 ± 20.3*
15	261.3 ± 15.9	239.5 ± 15.9*	236.2 ± 12.8*	238.9 ± 21.2*

Los resultados son la media en g ± la desviación estándar de los valores obtenidos de 6 ratas diferentes. (\*) Valores de actividad obtenidos de animales tratados que presentan una diferencia significativa respecto a los controles del mismo día (p<0.05).

**Figura 1.1.a**



**Fig. 1.1.a Evolución temporal del peso corporal (Ratas período I). Los resultados son la media ± S.D. de 6 animales diferentes. (○) Control, (□) CFB, (Δ) BFB, (◇) GFB.**

**Tabla 1.1.b. Evolución temporal del peso corporal en ratas (Período II)**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
0	132.1 ± 10.7	131.4 ± 10.5	131.4 ± 10.6	131.4 ± 10.9
1	138.5 ± 11.1	134.5 ± 15.0	139.5 ± 14.2	132.8 ± 14.0
2	147.6 ± 12.0	140.1 ± 18.1	143.3 ± 10.0	140.0 ± 6.2
3	160.9 ± 10.5	155.9 ± 11.2	148.4 ± 9.4	152.1 ± 10.7
4	165.2 ± 20.0	165.0 ± 8.0	162.2 ± 13.1	159.2 ± 14.0
7	201.3 ± 11.0	196.6 ± 18.0	185.1 ± 15.0	193.8 ± 13.1
8	214.0 ± 14.3	202.0 ± 12.8	187.7 ± 11.9	195.5 ± 15.5
9	220.7 ± 12.8	208.2 ± 12.5	190.6 ± 14.1	205.8 ± 11.7
10	231.3 ± 16.0	215.6 ± 12.0	208.3 ± 19.0	212.9 ± 9.0
11	237.2 ± 15.3	227.2 ± 15.6	202.3 ± 20.1	222.2 ± 22.3
14	270.9 ± 11.5	255.3 ± 16.6	227.3 ± 23.6	250.5 ± 22.5
15	275.7 ± 15.2	264.0 ± 15.0	239.5 ± 5.0	254.7 ± 25.0

Los resultados son la media en g ± la desviación estándar de los valores obtenidos de 8 ratas diferentes. (\*) Valores de actividad obtenidos de animales tratados que presentan una diferencia significativa respecto a los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

## **1.2. Evolución temporal del peso corporal en cobayas**

Como puede observarse en la siguiente tabla y en la correspondiente figura, la evolución corporal de los cobayas control y tratados con GFB ha sido, a diferencia de lo sucedido el caso de las ratas, muy similar entre los dos grupos.

**Tabla 1.2.** Evolución del peso corporal en cobayas.

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>GFB</b>
0	341.3 ± 27.6	331.2 ± 27.9
1	350.5 ± 26.6	340.1 ± 25.8
2	364.5 ± 28.6	359.1 ± 29.3
3	370.9 ± 24.4	363.0 ± 28.5
4	377.3 ± 18.1	373.4 ± 21.9
5	390.0 ± 20.3	377.4 ± 26.4
6	404.6 ± 25.8	389.2 ± 31.4
7	412.3 ± 20.1	400.7 ± 29.9
8	423.1 ± 21.4	409.5 ± 30.0
9	432.6 ± 22.0	423.5 ± 35.0
10	436.5 ± 22.7	437.8 ± 30.0
11	443.2 ± 20.3	430.5 ± 27.6
12	451.9 ± 21.0	435.8 ± 28.3
13	454.5 ± 25.5	450.3 ± 31.5
14	461.9 ± 29.1	461.4 ± 33.5
15	490.5 ± 28.2	472.3± 33.4

Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar obtenida a partir de un mínimo de 6 animales y un máximo de 12.

**Figura 1.2.**

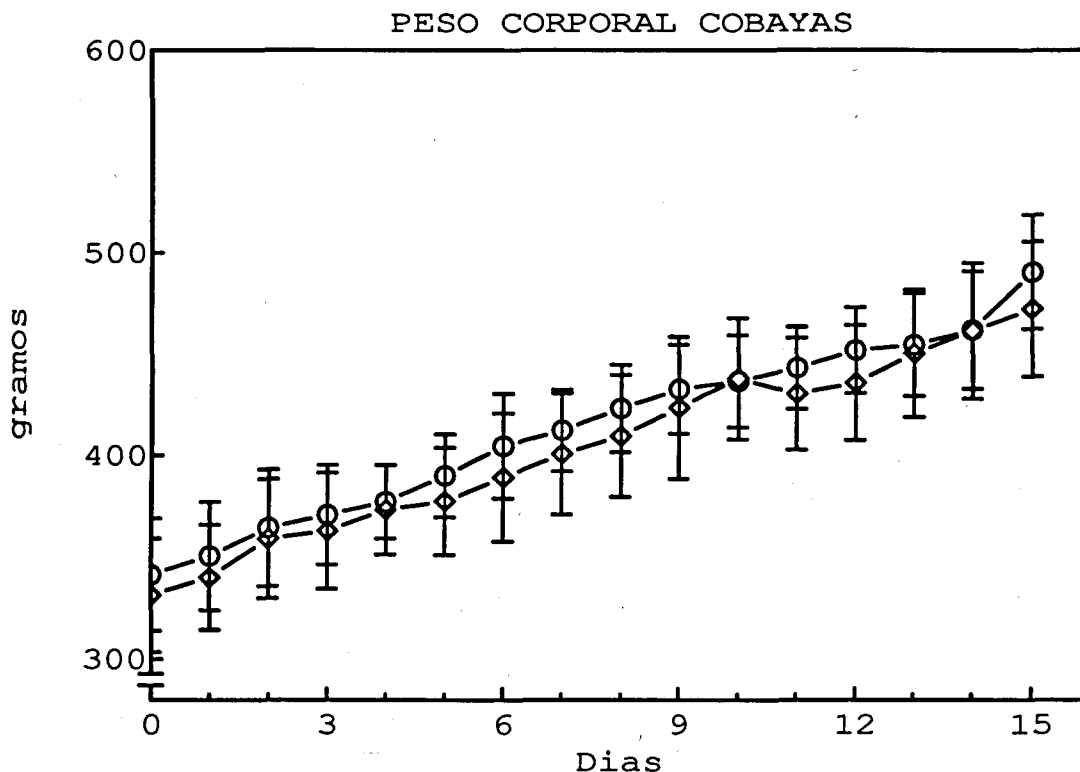


Fig. 1.2. Evolución temporal del peso corporal en cobayas. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar obtenida a partir de un mínimo de 6 animales y un máximo de 12. (○) Control, (◊) GFB.

### 1.3. Evolución temporal del consumo de alimento en ratas

En las ratas tratadas con BFB y GFB se observa un mayor consumo diario de alimento en contraste con el menor incremento ponderal que presentan estos dos grupos de tratamiento. Esta tendencia se ha observado por igual tanto en el período I (Tabla 1.3.a) como en el período II (Tabla 1.3.b). En el período I, por ejemplo, la cantidad de alimento ingerida por las ratas tratadas con GFB es ya estadísticamente distinta al grupo control ( $p < 0.05$ ) a partir del octavo día.

**Tabla 1.3.a. Consumo diario de alimento (Período I)**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	19.1 ± 1.8	16.7 ± 1.4	16.3 ± 1.6	18.0 ± 1.5
1	20.9 ± 2.2	21.9 ± 1.5	19.5 ± 1.9	23.1 ± 1.8
2	20.8 ± 2.1	22.7 ± 2.5	22.8 ± 3.5	25.1 ± 3.2*
3	22.1 ± 1.4	22.9 ± 1.7	25.9 ± 3.9	26.0 ± 2.1
4	24.1 ± 1.5	24.9 ± 2.3	27.5 ± 4.8	28.2 ± 1.8*
5	24.4 ± 1.4	24.9 ± 1.9	30.7 ± 5.2	31.1 ± 4.7
7	24.5 ± 1.7	24.3 ± 2.8	28.4 ± 7.9	29.0 ± 4.9*
8	26.1 ± 1.5	25.1 ± 3.2	28.7 ± 2.3	28.8 ± 4.6
9	26.4 ± 1.4	26.6 ± 3.2	32.1 ± 6.2	31.3 ± 3.5*
10	27.4 ± 2.6	25.4 ± 2.5	29.6 ± 6.1	35.8 ± 6.9*
11	28.9 ± 1.9	28.0 ± 2.1	36.6 ± 4.9*	38.2 ± 7.9*
14	27.4 ± 2.1	24.6 ± 2.3	39.1 ± 9.8*	32.2 ± 8.0*

Los resultados son la media en g ± la desviación estándar de los valores obtenidos de 6 ratas diferentes. (\*) Valores de actividad obtenidos de animales tratados que presentan una diferencia significativa respecto a los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.3.a. CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO**

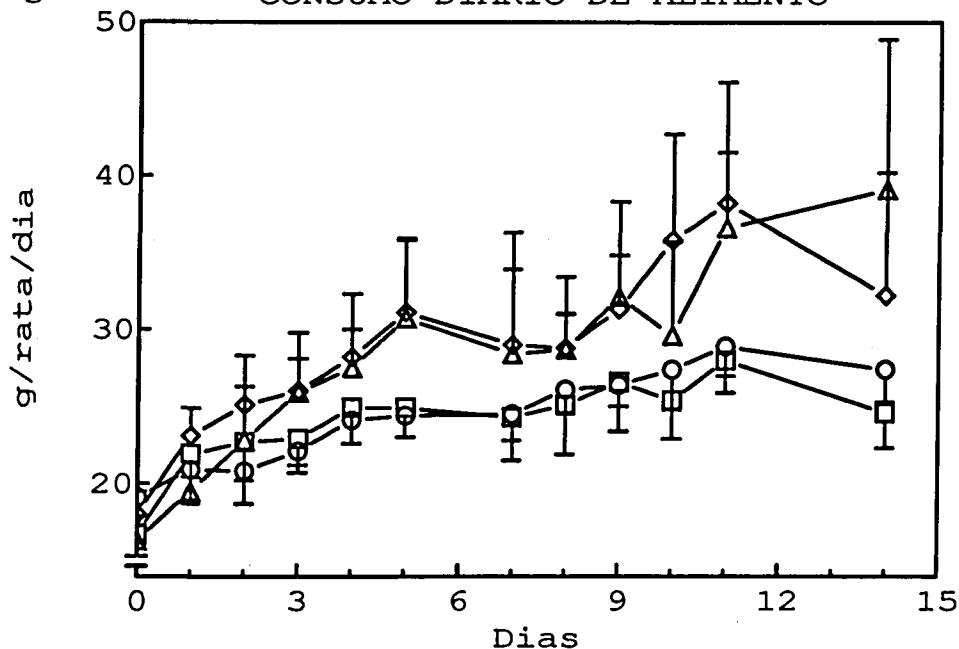


Fig. 1.3.a Evolución temporal del consumo de alimento (período I). Los resultados son la media ± S.D. de 6 ratas diferentes. (○) Control, (□) CFB, (Δ) BFB, (◇) GFB.

**Tabla 1.3.b. Consumo diario de alimento (Período II)**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
1	21.44 ± 2.77	21.01 ± 0.88	18.54 ± 2.77	18.35±4.17
2	22.93 ± 1.55	23.03 ± 0.99	22.73 ± 3.44	26.20±5.36
3	24.44 ± 2.10	25.65 ± 2.55	27.19 ± 4.37	28.93±6.00
4	25.67 ± 3.04	25.94 ± 4.17	29.65 ± 6.17	31.71±5.8*
7	27.78 ± 2.54	29.32 ± 3.17	31.64 ± 6.60	33.10±4.07
8	27.61 ± 3.60	31.71 ± 4.48	33.15 ± 5.74	34.47±3.61
9	28.94 ± 1.66	31.53 ± 2.39	32.62 ± 5.10	35.91±4.7*
10	30.28 ± 2.06	32.28 ± 4.30	38.68 ± 8.1*	34.65±4.63
11	28.25 ± 5.75	29.06 ± 6.20	35.85 ± 9.4*	35.94±9.9*
14	32.58 ± 4.09	32.28 ± 2.68	36.20 ± 7.73	36.20±6.54
15	30.80 ± 4.19	36.41 ± 6.39	42.55 ± 8.7*	38.45±8.31

Los resultados son la media en g ± la desviación estándar de los valores obtenidos de 6 ratas diferentes. (\*) Valores de actividad obtenidos de animales tratados que presentan una diferencia significativa respecto a los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

El control de la cantidad de alimento ingerida diariamente resulta muy difícil en el caso de los cobayas, dado que estos animales tienden a desperdiciar parte de la comida que se les suministra. Debido a la dispersión de los valores, no se muestran los datos obtenidos respecto a la consumo diario en esta especie animal.

#### **1.4. Relación peso hepático/peso corporal**

La proliferación peroxisómica que producen los fibratos va acompañada de una marcada hepatomegalia (Bieri y Lhuguenot, 1993). Esta suele definirse como el incremento en el peso relativo del hígado respecto al peso corporal. La relación entre ambos pesos en las ratas control y tratadas de los períodos I y II se muestra en las Tablas 1.4.a y 1.4.b). Puede observarse que si bien este parámetro no experimenta variación en ratas control, aumenta

de manera muy significativa desde el segundo día de tratamiento con CFB, BFB y GFB. El orden de potencia respecto a la inducción de hepatomegalia en las ratas es BFB>CFB=GFB.

**Tabla 1.4.a. Relación peso hepático/peso corporal (Período I)**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	5.3 ± 0.2			
1	5.3 ± 0.2	5.4 ± 0.2*	5.4 ± 0.2*	5.4 ± 0.2*
2	5.4 ± 0.3	6.3 ± 0.4*	6.7 ± 0.5*	6.2 ± 0.4*
4	5.6 ± 0.5	6.9 ± 0.5*	7.9 ± 0.6*	6.9 ± 0.6*
7	4.9 ± 0.2	7.4 ± 0.6*	8.5 ± 1.0*	7.2 ± 0.6*
10	4.9 ± 0.3	7.1 ± 0.6*	8.3 ± 1.0*	7.1 ± 0.4*
15	5.0 ± 0.4	7.2 ± 0.6*	8.0 ± 0.8*	7.2 ± 0.3*

Los resultados corresponden a la relación de peso hepático/corporal expresada en % ± la desviación estándar, y son la media de los valores obtenidos para 6 ratas. (\*) Valores de actividad que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.4.a** RELACION PESO HEPATICO/CORPORAL

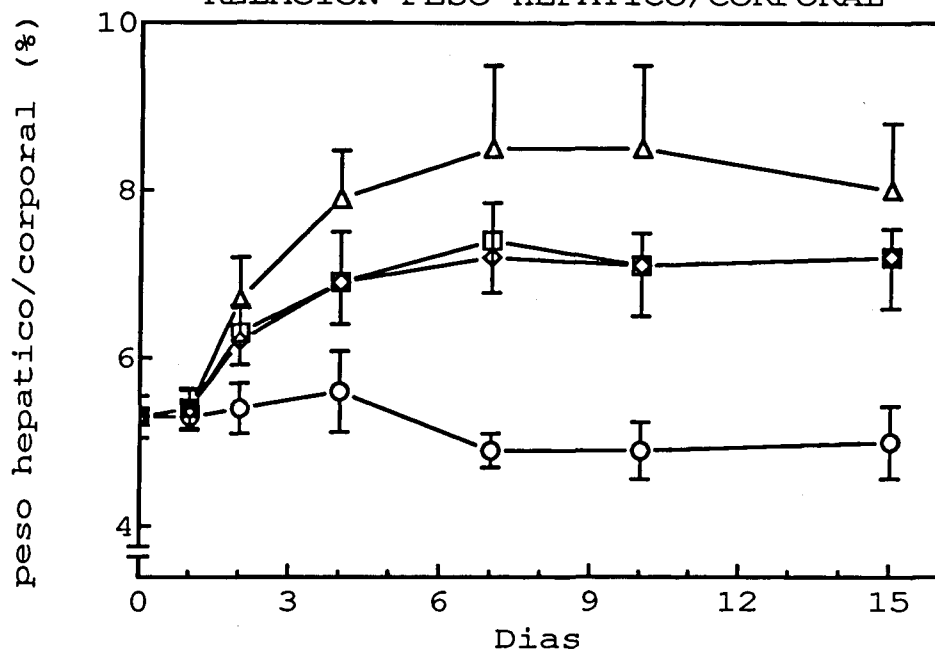


Fig. 1.4.a. Relación peso hepático/peso corporal en rata (Período I). Los resultados están expresados en % ± desviación estándar, y corresponden a la media de valores de 6 ratas distintas. (○) Control, (□) CFB, (Δ) BFB, (◊) GFB.

**Tabla 1.4.b. Relación peso hepático/peso corporal (Período II)**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
0	5.4 ± 0.3			
1	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.5	5.5 ± 0.5	5.2 ± 0.8
2	5.6 ± 0.3	5.7 ± 0.6*	6.9 ± 0.5*	6.5 ± 0.5*
4	5.7 ± 0.1	7.1 ± 0.3*	7.9 ± 0.3*	6.9 ± 0.7*
7	5.4 ± 0.2	7.1 ± 0.8*	8.5 ± 0.7*	7.7 ± 0.9*
10	5.2 ± 0.4	7.3 ± 0.7*	9.2 ± 0.9*	7.5 ± 0.5*
15	5.3 ± 0.3	7.5 ± 0.8*	8.9 ± 0.8*	8.1 ± 0.6*

Los resultados corresponden a la relación de peso hepático/corporal expresada en % ± la desviación estándar, y son la media de los valores obtenidos para 8 ratas. (\*) Valores de actividad que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

## **Resultados en cobaya**

A diferencia de lo sucedido en rata, la relación peso hepático/corporal no se incrementa de forma significativa en los cobayas tratados con GFB, como es de esperar de una especie poco sensible a la proliferación peroxisómica. Así, el peso relativo del hígado (expresado en % respecto al peso corporal) ha sido de  $6.82 \pm 0.84$  en cobayas control, y de  $7.34 \pm 0.81$  en cobayas tratados con GFB. Estos resultados son la media ± la desviación estándar obtenida a partir de 12 animales de cada grupo.

## **1.5. Parámetros plasmáticos**

### **1.5.1. Concentración plasmática de colesterol**

Los tres fármacos estudiados han resultado ser efectivos respecto a la disminución de la concentración plasmática de colesterol en ratas



normolipidémicas. Las diferencias son estadísticamente significativas respecto a los valores control desde el segundo día de tratamiento con CFB y BFB, en que se obtienen disminuciones en la concentración plasmática de colesterol de alrededor de un 30-40 %. A partir de este momento, el efecto hipocolesterolemiante de estos dos fármacos se mantiene prácticamente constante hasta el final del tratamiento. En cambio, el GFB parece ser más efectivo durante los primeros días, y a partir del día 4 las diferencias respecto a las ratas control pierden significación estadística.

**Tabla 1.5.1.a. Concentración plasmática de colesterol (Período I)**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
0	90.9 ± 6.4			
1	96.5 ±14.8	77.4 ± 4.3	80.8 ± 7.6	68.2 ±24.4*
2	112.9 ± 6.9	81.3 ± 8.2*	71.1 ±11.7*	80.5 ±18.7*
4	105.2 ±23.5	73.6 ± 4.1*	70.4 ±12.8*	73.4 ±23.4*
7	104.0 ±12.8	64.2 ± 5.9*	65.4 ± 9.3*	87.3 ±28.3
10	97.3 ±29.3	73.9 ±18.8*	58.9 ± 6.4*	103.5 ±11.2
15	94.8 ±13.7	63.7 ± 7.2*	62.5 ± 5.6*	101.4 ±18.4*

Los resultados están expresados en mg/dl de plasma y corresponden cada uno a la media de los valores individuales obtenidos de 5 ratas diferentes. (\*) Valores que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.5.1.a**

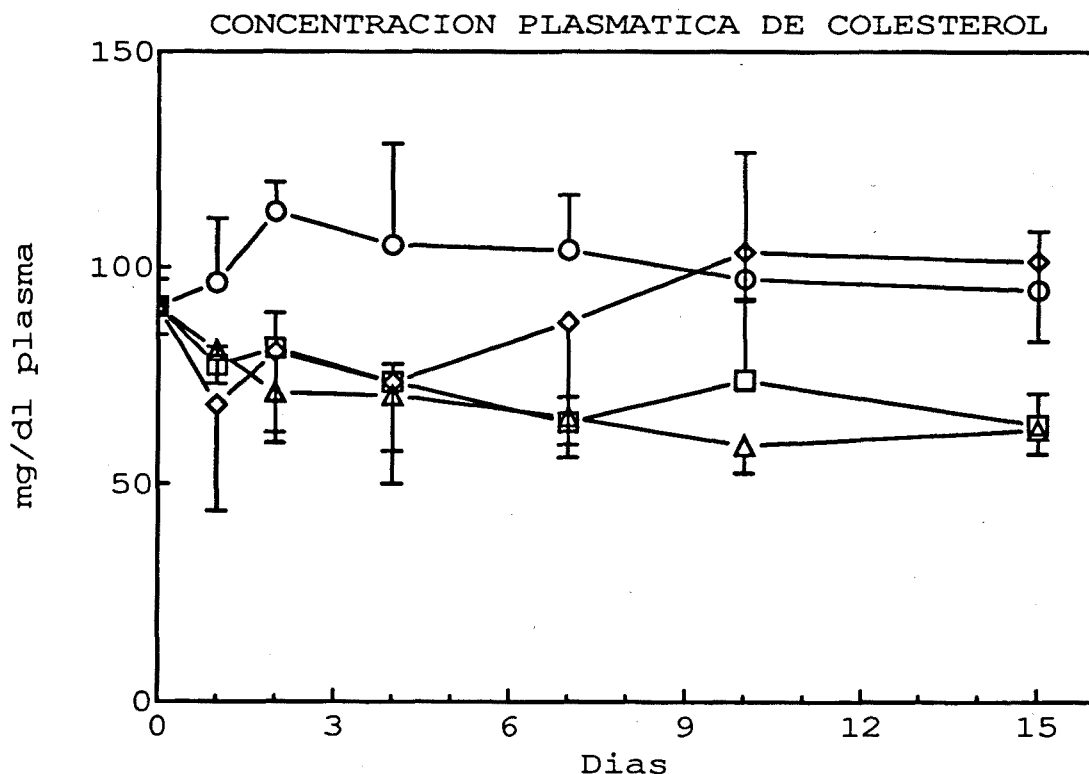


Fig. 1.5.1.a Concentración plasmática de colesterol (período I). Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en mg/dl de plasma. (○) Control, (□) CFB, (△)BFB,(◇) GFB.

**Tabla 1.5.1.b. Concentración plasmática de colesterol (Período II)**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	94.3 $\pm$ 11.0			
1	99.2 $\pm$ 8.9	84.0 $\pm$ 7.0 *	83.7 $\pm$ 7.1 *	83.5 $\pm$ 14.6*
2	94.6 $\pm$ 14.0	73.3 $\pm$ 9.0 *	76.5 $\pm$ 9.0*	85.0 $\pm$ 13.4*
4	94.4 $\pm$ 5.7	65.7 $\pm$ 15.0*	64.5 $\pm$ 7.1*	77.2 $\pm$ 17.9*
7	90.7 $\pm$ 11.0	59.6 $\pm$ 8.6 *	68.2 $\pm$ 12.8*	80.8 $\pm$ 25.5*
10	88.5 $\pm$ 10.7	59.0 $\pm$ 8.8*	50.6 $\pm$ 13.4*	87.8 $\pm$ 21.8
15	82.8 $\pm$ 13.0	49.9 $\pm$ 14.3*	50.5 $\pm$ 11.4*	77.0 $\pm$ 16.7

Los resultados están expresados en mg/dl de plasma y corresponden cada uno a la media de los valores individuales obtenidos de 8 ratas diferentes. (\*) Valores que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

### 1.5.2. Concentración plasmática de triglicéridos

Los fármacos ensayados también se han mostrado efectivos como hipotrigliceridemiante en ratas normolipidémicas. El orden de potencia para este efecto parece ser BFB=GFB>CFB. Las disminuciones en el nivel plasmático de triglicéridos, que llegan a ser del 50 % en el caso de ratas tratadas con BFB y GFB, son significativas ( $p<0.05$ ) respecto a los controles ya desde el primer día de tratamiento.

Tabla 1.5.2.a. Concentración plasmática de triglicéridos (Período I)

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	128.9 ±11.9			
1	115.8 ±30.5	73.0 ± 7.9*	71.2 ±13.7*	54.7 ±14.6*
2	127.4 ±18.5	92.5 ±25.7*	73.2 ±27.0*	81.9 ±22.4*
4	105.2 ±39.5	63.8 ± 7.8*	49.5 ±10.5*	50.9 ±14.8*
7	98.9 ±38.6	66.2 ± 4.8*	52.2 ±12.4*	50.5 ±17.4*
10	105.2 ±38.6	89.9 ±19.4	50.9 ±18.2*	74.2 ±19.0
15	142.7 ±50.2	97.3 ±27.7*	60.8 ±17.2*	81.3 ±40.5*

Los resultados están expresados en mg/dl de plasma y corresponden cada uno a la media de los valores individuales obtenidos de 5 ratas diferentes. (\*) Valores que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p<0.05$ ).

**Figura 1.5.2.a**

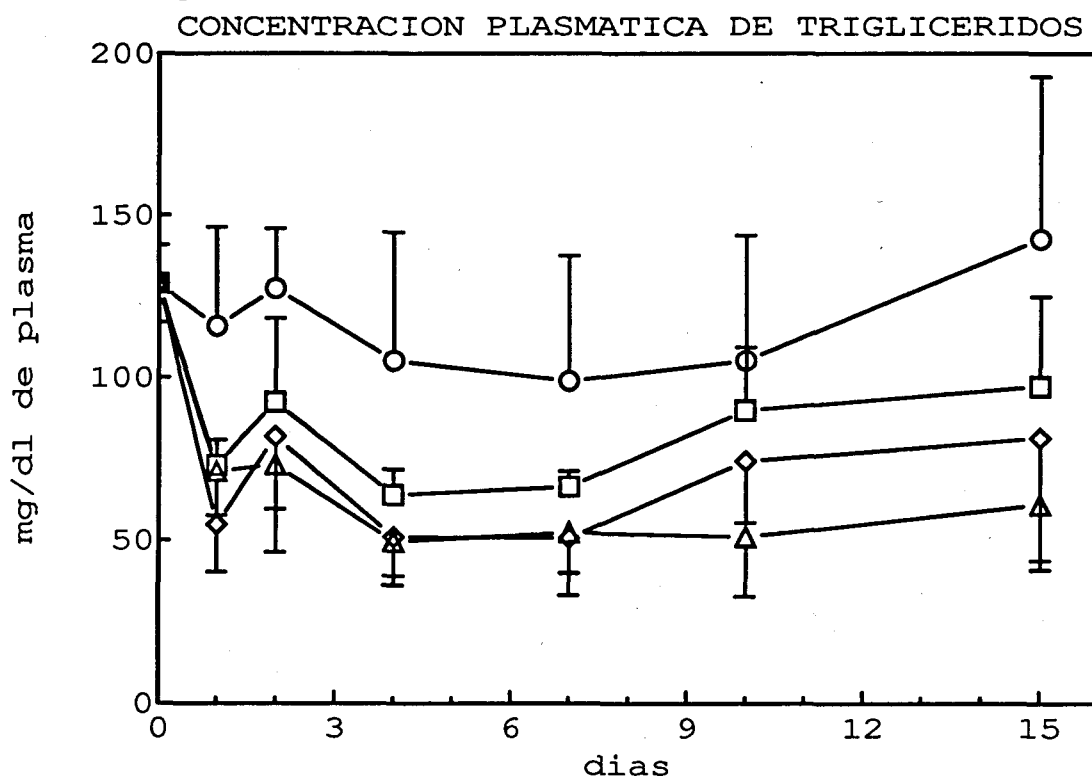


Fig. 1.5.2.a Triglicéridos plasmáticos (período I). Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 5 experimentos diferentes, y están expresados en mg/dl de plasma. (○)Control, (□) CFB, (△) BFB, (◇)GFB.

**Tabla 1.5.2.b. Concentración plasmática de triglicéridos**

(Período II)

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	132.6 $\pm$ 30.8			
1	127.1 $\pm$ 20.8	87.7 $\pm$ 26.5*	65.7 $\pm$ 16.5*	70.6 $\pm$ 16.7*
2	124.9 $\pm$ 14.2	104.0 $\pm$ 31.4*	80.8 $\pm$ 19.3*	79.1 $\pm$ 13.7*
4	102.6 $\pm$ 24.7	60.7 $\pm$ 10.8*	50.4 $\pm$ 11.5*	54.5 $\pm$ 15.5*
7	122.1 $\pm$ 18.1	77.7 $\pm$ 13.2*	48.0 $\pm$ 16.3*	44.7 $\pm$ 20.6*
10	102.3 $\pm$ 14.1	70.3 $\pm$ 16.7*	43.2 $\pm$ 9.10*	49.7 $\pm$ 15.1*
15	122.9 $\pm$ 24.3	73.0 $\pm$ 33.7*	48.3 $\pm$ 17.8*	44.7 $\pm$ 9.91*

Los resultados están expresados en mg/dl de plasma y corresponden cada uno a la media de los valores individuales obtenidos de 8 ratas diferentes. (\*) Valores que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).

## 2. PARAMETROS ENZIMATICOS *IN VITRO*

Antes de proceder a la administración de CFB, BFB y GFB a ratas, se estudió el efecto *in vitro* de estos mismos fármacos sobre diversos sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis hepática de ácidos grasos. Los resultados referentes al efecto *in vitro* de CFB, BFB y GFB sobre enzimas del metabolismo hepático en rata (Alegret y col., 1991; Sánchez y col., 1992 a y b; Sánchez y col., 1993) se resumen en la siguiente Tabla:

**Tabla 2.1.** Efecto *in vitro* de CFB, BFB y GFB sobre enzimas del metabolismo lipídico en rata

Enzima	CFB	BFB	GFB
NADH CC Rd	↑ (n.d)	↑ (n.d)	↑↑ (9.5)
NADPH CC Rd	=	=	=
NADH Cb <sub>5</sub> Rd	=	=	=
PCH Ms	↓ (2.85)	↓↓ (0.97)	↓↓↓ (0.15)
PCH MP	↓ (1.49)	↓↓ (0.58)	↓↓↓ (0.13)
PCH ML	↓ (n.d)	↓↓ (n.d)	↓↓↓ (n.d)
PCH cit	↓ (n.d)	↓↓ (n.d)	↓↓↓ (n.d)
PCH cit(*)	=	=	=
PCS	=	=	↓ (2.8)
<b>Elongación</b>			
. s. saturados	↓↓ (0.59)	↓↓ (0.43)	↓↓↓ (0.13)
. s. monoinsat.	↓↓ (0.53)	↓↓ (0.47)	↓↓↓ (0.18)
. s. poliinsat.	↓ (1.06)	↓↓ (0.48)	↓↓↓ (0.10)
<b>Desaturación</b>			
. Delta-9	=	=	=
. Delta-5	↓ (n.d)	↓↓ (n.d)	↓↓↓ (n.d)
. Delta-6	↓ (n.d)	↓↓ (n.d)	↓↓↓ (n.d)

Efecto *in vitro* de CFB, BFB y GFB sobre enzimas del metabolismo de ácidos grasos: ↑ inducción; ↓ inhibición moderada; ↓↓ inhibición fuerte; ↓↓↓ inhibición muy fuerte. ; = actividad no modificada. Entre paréntesis se muestra el valor de CI<sub>50</sub> (mM); n.d=no determinado. Abreviaciones: NAD(P)H CC Rd: NADP(H) citocromo c reductasa; NADH Cb<sub>5</sub> Rd: NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa; PCH: palmitoil-CoA hidrolasa, ms: microsomal, MP mitocondrias pesadas, cit citosol (\*) de cerebro; PCS: palmitoil-CoA sintetasa; s: substratos.

De igual modo, antes de iniciar los estudios *in vivo* con GFB en cobaya, se procedió a determinar la acción *in vitro* de este fármaco sobre estas mismas actividades enzimáticas en esta especie animal. De hecho, sólomente se han estudiado aquellas actividades que se había comprobado previamente que resultaban afectadas en rata. Los ensayos se han realizado adicionando el fármaco de modo que su concentración final en el medio de incubación sea de 1 o 5 mM. El GFB se añade al medio de incubación a partir de una solución del fármaco ajustada a pH 8-8.5 con NaOH 0.1 N. En todos los casos, el tiempo de preincubación en presencia del fármaco ha sido de 5 minutos. Los resultados obtenidos han sido los siguientes :

**Tabla 2.2.** Efecto *in vitro* del GFB sobre enzimas del metabolismo lipídico de cobaya

Enzima	Control	GFB 1 mM	GFB 5 mM	% variación
NADH CCRd	690.8 ± 102.5	765.3 ± 143.4	1037.7 ± 174.4	50.2 %
PCH Ms	2.75 ± 0.34	2.28 ± 0.29		
PCS	50.5 ± 6.7	49.5 ± 17.5	43.4 ± 8.5	
Elongación				
. s. saturado	0.42 ± 0.18	0.044 ± 0.016	0.002 ± 0.002	99.5 %
. s. monoins.	0.20 ± 0.07	0.016 ± 0.015	5.10 <sup>-4</sup> ± 9.10 <sup>-4</sup>	99.7 %
. s. poliins.	0.15 ± 0.05	0.034 ± 0.004	0.02 ± 0.016	86.7 %
β-oxidación	2.55 ± 0.86	1.36 ± 0.52	0	100 %

Actividades enzimáticas expresadas en nmol/min/mg de proteína correspondientes a la media ± desviación estándar de los valores correspondientes a tres cobayas distintos. El % de variación de la actividad enzimática se refiere al valor obtenido a concentración 5 mM de GFB.

### **3. PARAMETROS ENZIMATICOS *IN VIVO*.**

#### **3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES**

##### **3.1.1. DISTRIBUCION SUBCELULAR**

La técnica del fraccionamiento celular se basa en la premisa de que cada orgánulo tiene constituyentes o características que le confieren singularidad. Así, existen enzimas, denominados "marcadores", que se localizan predominante y uniformemente en un orgánulo específico. La determinación de una serie de enzimas marcadores en todas las fracciones subcelulares obtenidas permite determinar el enriquecimiento relativo de cada una respecto al homogenado, así como el grado de contaminación por otros orgánulos (Findlay y Evans, 1987).

Dado que la separación de los distintos orgánulos celulares por centrifugación se basa en la diferencia en la velocidad de sedimentación de los mismos, es necesario comprobar que el tratamiento con fibratos, a pesar de sus características proliferadoras, no altera este parámetro. Por ello, antes de iniciar los estudios *in vivo*, se determinó la distribución subcelular hepática en animales control y tratados. Con este fin se utilizaron ratas control y en ratas tratadas con CFB al 0.3 % p/p durante 15 días.

Para obtener fracciones suficientemente puras, con contaminación por otros orgánulos minoritaria, y también para conseguir un alto rendimiento, se modificó ligeramente el protocolo de centrifugación (ver Métodos). Para cada fracción subcelular obtenida (núcleos, mitocondrias pesadas, mitocondrias ligeras, citosol y microsomas) se determinaron los siguientes enzimas marcadores (Findlay y Evans, 1987):

- NADPH citocromo c reductasa, marcador de microsomas
- Succinato deshidrogenasa, marcador de mitocondrias
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, marcador de citosol

-  $\beta$ -oxidación peroxisómica, marcador de peroxisomas

Los resultados presentados en las Tablas 3.1. (1 a 5), corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar obtenida a partir de 6 ratas control y 6 tratadas. El % de actividad de cada fracción se ha calculado en referencia a la actividad total (en nmol/min) del homogenado hepático libre de núcleos.

La comparación de los resultados obtenidos a partir de animales control y tratados permite afirmar que el tratamiento con CFB, y por extensión, con fibratos en general, no modifica el patrón de distribución subcelular hepático, de acuerdo con resultados presentados por otros autores (Cites). Cabe destacar, sin embargo, la variación detectada en la distribución del sistema de  $\beta$ -oxidación peroxisómica tras el tratamiento de ratas con CFB. Es un hecho conocido que durante la fase de proliferación de los peroxisomas, debida a la administración de fibratos, el tamaño de estos orgánulos es menor. De ahí que en ratas tratadas estos orgánulos precipiten más en la fracción de mitocondrias ligeras que en las pesadas. Por otro lado, los fibratos incrementan la fragilidad de los peroxisomas (Crane y col., 1990), hecho que explica la mayor actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica observada en el citosol de ratas tratadas con CFB.

**Tabla 3.1.1. Recuperación proteica en ratas control y tratadas (CFB)**

<b>Fracción</b>	<b>Ratas control</b>	<b>Ratas CFB</b>
N	2	1.4
MP	19	25
ML	4.5	4
Cit	67	53
Ms	11.5	11

Recuperación proteica expresada en % respecto al sobrenadante libre de núcleos (700 g). Se ha calculado a partir de los mg totales de proteína obtenidos en cada fracción .



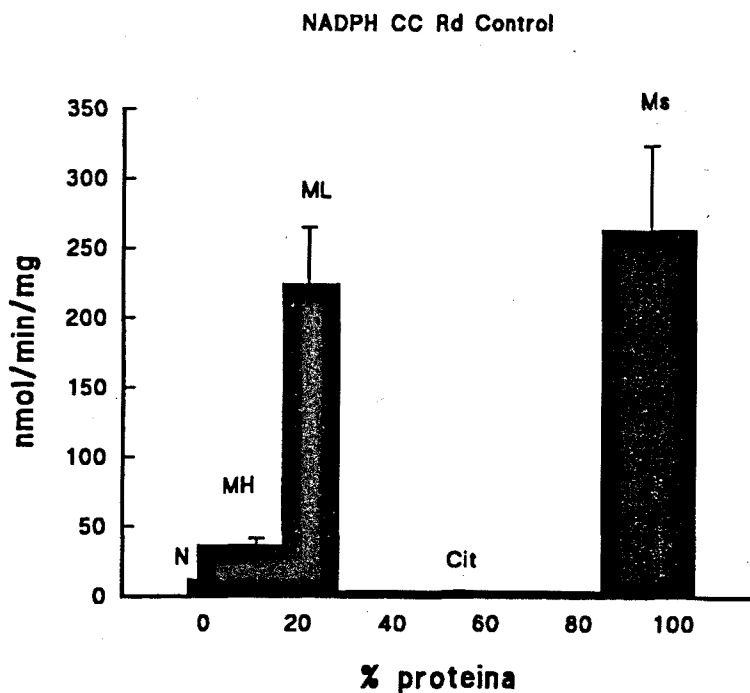
Como puede observarse en la anterior tabla, la recuperación proteica fue alta en ambos grupos (94-104 %). El porcentaje asignado a cada fracción prácticamente no varía, aunque el ligero aumento en la fracción de mitocondrias pesadas podría deberse a la proliferación de los peroxisomas.

Tabla 3.1.2. NADPH citocromo c reductasa

Fracción	RATAS		CFB	
	nmol/min/mg	% actividad	nmol/min/mg	% actividad
N	12.5 ± 7.2	0.5	17.9 ± 4.5	0.4
MP	37.2 ± 4.7	16.9	28.6 ± 1.4	10.8
ML	224.8 ± 40.1	23.1	278.9 ± 58.9	15.9
Cit	4.3 ± 0.2	6.8	5.2 ± 0.3	4.2
Ms	264.0 ± 60.1	64.7	400.8 ± 68.7	65.2

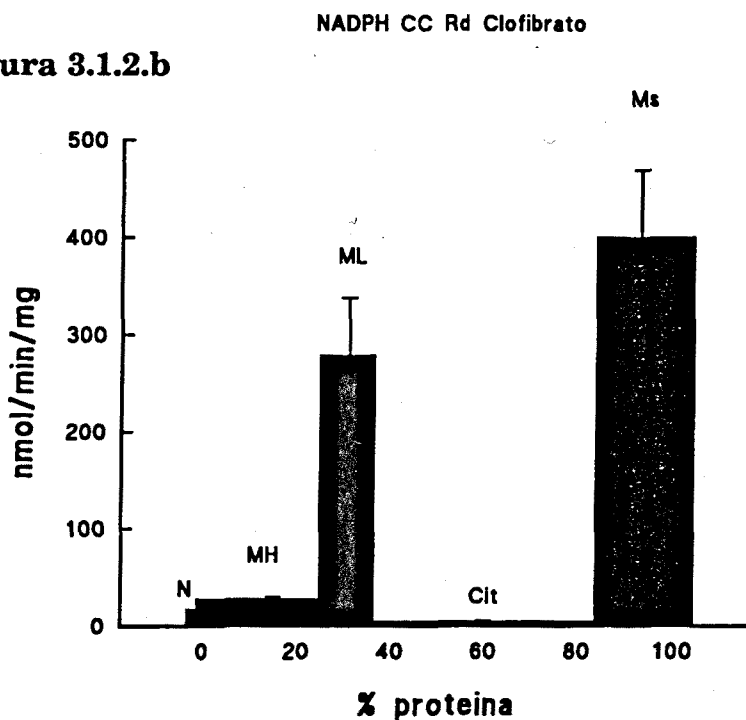
Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar obtenida a partir de 6 animales de cada grupo. El % de actividad de cada fracción se ha calculado según la actividad total en nmol/min referida a la actividad, también en nmol/min del sobrenadante libre de núcleos (700 g).

**Figura 3.1.2.a**



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Figura 3.1.2.b**



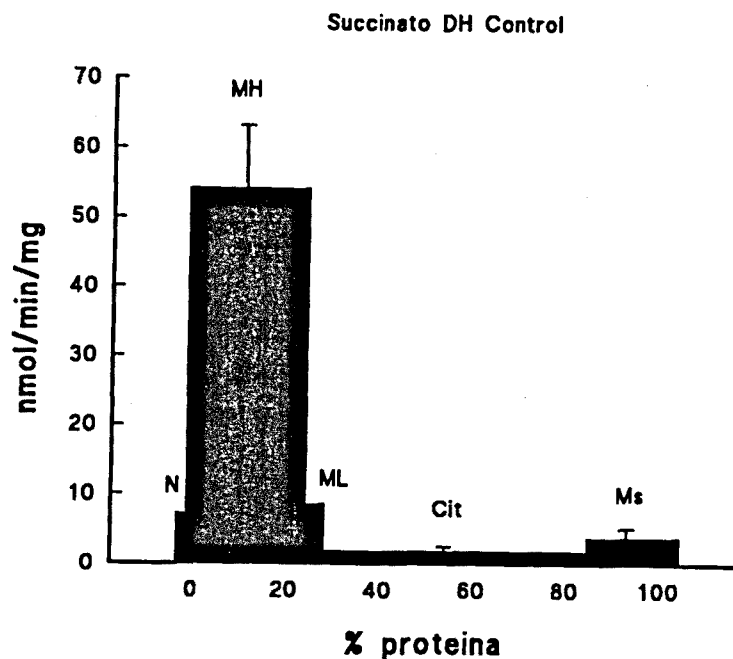
La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Tabla 3.1.3. Succinato deshidrogenasa**

Fracción	RATAS		CFB	
	nmol/min/mg	% actividad	nmol/min/mg	% actividad
N	7.3 ± 1.4	1.0	7.1 ± 1.3	0.6
MP	54.2 ± 8.9	89.7	52.7 ± 4.5	80.8
ML	8.7 ± 3.0	3.1	7.7 ± 2.0	1.7
Cit	1.8 ± 0.6	10.3	2.2 ± 1.0	6.8
Ms	3.9 ± 1.3	3.8	2.1 ± 0.7	1.4

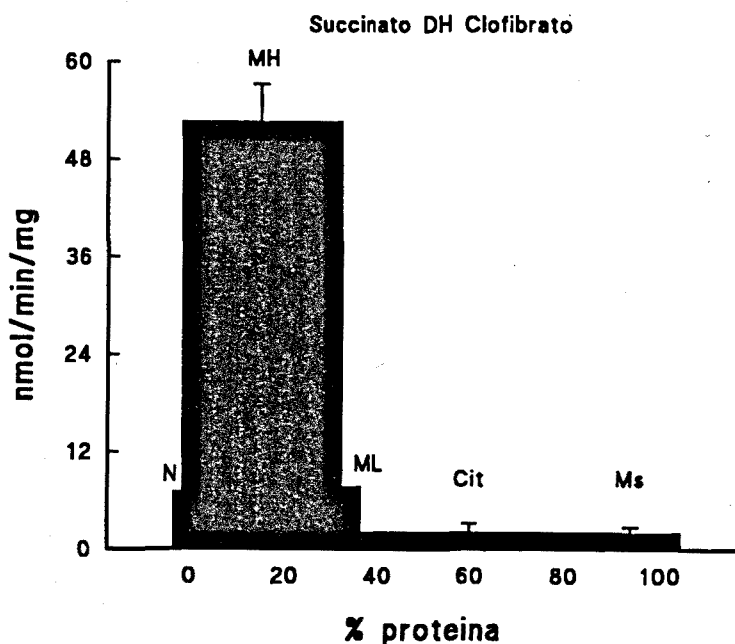
Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar obtenida a partir de 6 animales de cada grupo. El % de actividad de cada fracción se ha calculado según la actividad total en nmol/min referida a la actividad, también en nmol/min del sobrenadante libre de núcleos (700 g).

**Figura 3.1.3.a.**



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Figura 3.1.3.b.**



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

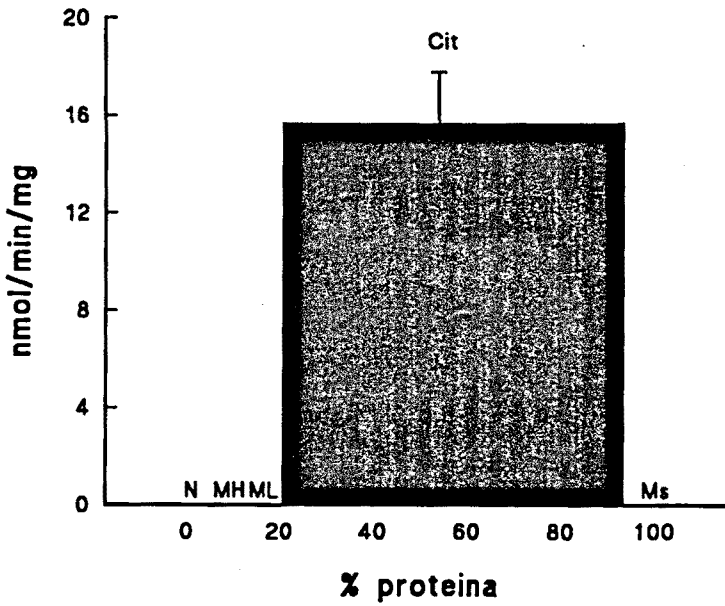
**Tabla 3.1.4. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa**

Fracción	RATAS		CFB	
	nmol/min/mg	% actividad	nmol/min/mg	% actividad
N	0	0	0	0
MP	0	0	0	0
ML	0	0	0	0
Cit	15.7 ± 2.1	100.8	17.3 ± 2.0	97.0
Ms	0	0	0	0

Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar obtenida a partir de 6 animales de cada grupo. El % de actividad de cada fracción se ha calculado según la actividad total en nmol/min referida a la actividad, también en nmol/min del sobrenadante libre de núcleos (700 g).

**Figura 3.1.4.a.**

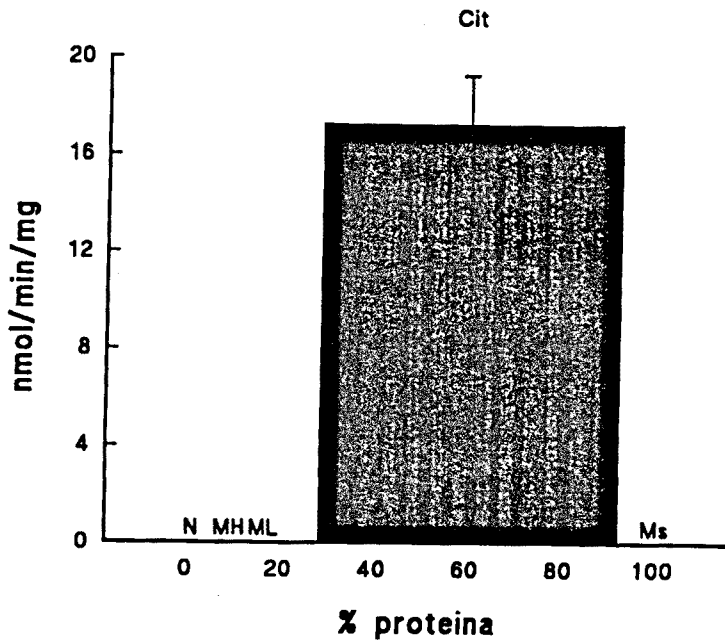
Glucosa 6P DH Control



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Figura 3.1.4.b.**

Glucosa 6P DH clofibrato



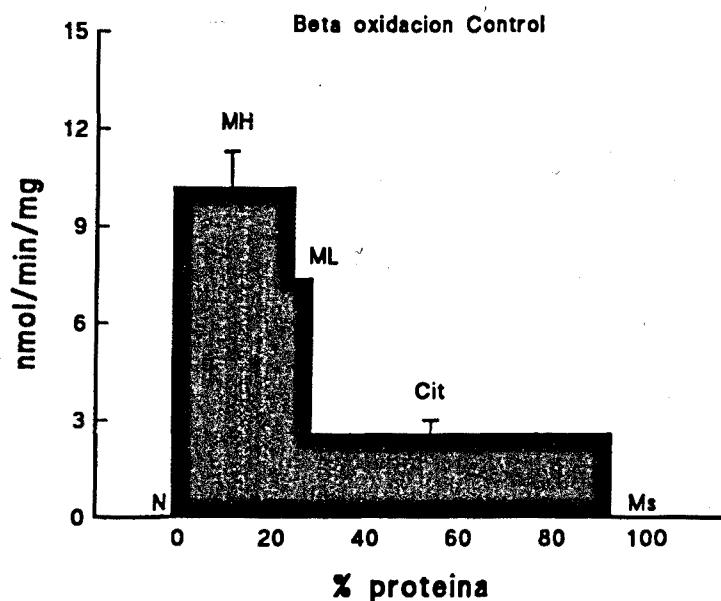
La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Tabla 3.1.5.  $\beta$ -oxidación peroxisómica**

Fracción	RATAS	CONTROL	RATAS	CFB
	nmol/min/mg	% actividad	nmol/min/mg	% actividad
N	0	0	0	0
MP	10.2 $\pm$ 1.1	40.7	50.8 $\pm$ 2.7	29.2
ML	7.4 $\pm$ 1.3	6.7	82.7 $\pm$ 8.8	7.3
Cit	2.6 $\pm$ 0.4	36.9	62.6 $\pm$ 10.4	74.9
Ms	0	0	5.7 $\pm$ 0	1.2

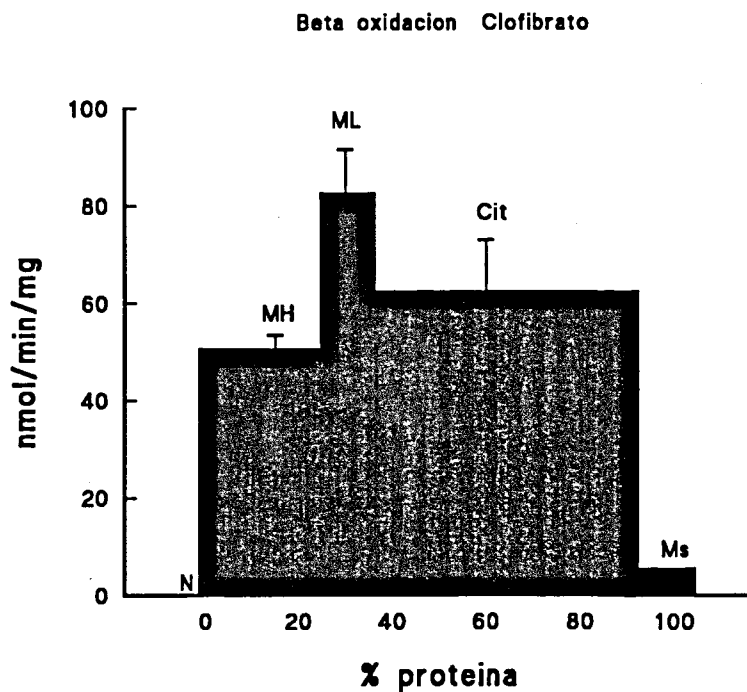
Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar obtenida a partir de 6 animales de cada grupo. El % de actividad de cada fracción se ha calculado según la actividad total en nmol/min referida a la actividad, también en nmol/min del sobrenadante libre de núcleos (700 g).

**Figura 3.1.5.a.**



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitochondrias pesadas; ML: mitochondrias ligeras, cit: citosol; Ms: microsomas.

**Figura 3.1.5.b.**



La base del histograma corresponde al % de proteína de cada fracción, y la altura a su actividad específica (nmol/min/mg). N: núcleos, MH: Mitocondrias pesadas; ML: mitocondrias ligeras, cit: citósol; Ms: microsomas.

### 3.1.2. CONDICIONES OPTIMAS PARA LOS ENSAYOS

Para todas las actividades enzimáticas estudiadas en este trabajo, se han realizado ensayos previos para determinar el rango de concentraciones proteicas que guardan una relación lineal con la actividad enzmática. Estos estudios preliminares se realizaron tanto en animales control como en animales tratados con GFB al 0.3 % en la dieta. En algunos casos no se realizaron las curvas proteína/actividad por coincidir esta con la obtenida en ensayos previos de este grupo de trabajo para animales no tratados.

Para cada enzima, la actividad es lineal en el rango de proteínas expuesto a continuación:

	Rata	Cobaya
- Palmitoil-CoA hidrolasa microsomal	0 - 100 µg	0 - 600 µg
- Palmitoil-CoA hidrolasa mitoc.	0 - 200 µg	0 - 600 µg
- Palmitoil-CoA hidrolasa citosólica	0 - 150 µg	0 - 300 µg
- NADH citocromo b <sub>5</sub> reductasa	0 - 150 µg	
- NADH citocromo c reductasa	0 - 150 µg	0 - 200 µg
- NADPH citocromo c reductasa	0 - 200 µg	0 - 300 µg
- Palmitoil-CoA sintetasa	0 - 200 µg	0 - 800 µg
- β-oxidación peroxisómica	0 - 400 µg	0 - 500 µg
- Elongación microsomal	0 - 800 µg	0 - 1000 µg
- Delta-9 desaturasa	0 - 800 µg	0 - 1000 µg
- Delta-5 y Delta-6 desaturasa		



## 3.2. $\beta$ -OXIDACION PEROXISOMICA

### Resultados en rata

Al igual que los parámetros no enzimáticos, la actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica se ha determinado en todos los grupos de animales, durante los dos años que han durado los estudios *in vivo*. En esta sección se presentan los resultados obtenidos para los dos períodos, I y II, que han sido muy similares.

Los actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica se ha determinado utilizando la fracción correspondiente al sobrenadante de la primera centrifugación (700 g) a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$ . La actividad de este sistema enzimático se incrementa con un orden de potencia BFB>CFB>GFB. Las diferencias son significativas ( $p<0.05$ ) respecto al control a partir del primer o segundo día de tratamiento con CFB y BFB. El GFB no sólo es el fármaco de menor potencia, sino el que produce inducciones significativas de manera más tardía, a partir del día 7 de tratamiento. Las inducciones máximas, que corresponden aproximadamente a un 650 % para el CFB, un 1000 % para el BFB, y un 550 % para el GFB (asignando un 100 % a los valores control), se obtienen a partir del día 10 de tratamiento. La evolución temporal de los valores de actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica en rata se muestran en las Tablas y Figuras 3.2.a y 3.2.b.

**Tabla 3.2.a.  $\beta$ -oxidación peroxisómica (Período I)**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	4.6 $\pm$ 0.9			
1	4.3 $\pm$ 0.9	7.7 $\pm$ 1.7	9.1 $\pm$ 1.9	5.2 $\pm$ 1.1
2	4.7 $\pm$ 0.4	13.4 $\pm$ 1.2*	17.8 $\pm$ 4.4*	8.8 $\pm$ 2.4
4	4.3 $\pm$ 0.8	20.8 $\pm$ 9.1*	30.2 $\pm$ 8.8*	10.9 $\pm$ 3.3
7	4.6 $\pm$ 0.7	29.8 $\pm$ 10.2*	41.6 $\pm$ 10.5*	17.9 $\pm$ 8.4*
10	4.2 $\pm$ 0.7	27.1 $\pm$ 6.6*	42.4 $\pm$ 17.5*	24.1 $\pm$ 12.9*
15	3.6 $\pm$ 0.5	27.1 $\pm$ 6.6*	38.5 $\pm$ 10.8*	18.6 $\pm$ 6.2*

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=6. (\*) Valores de actividad que presentan diferencia significativa respecto al valor control del mismo día ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3.2.a.**

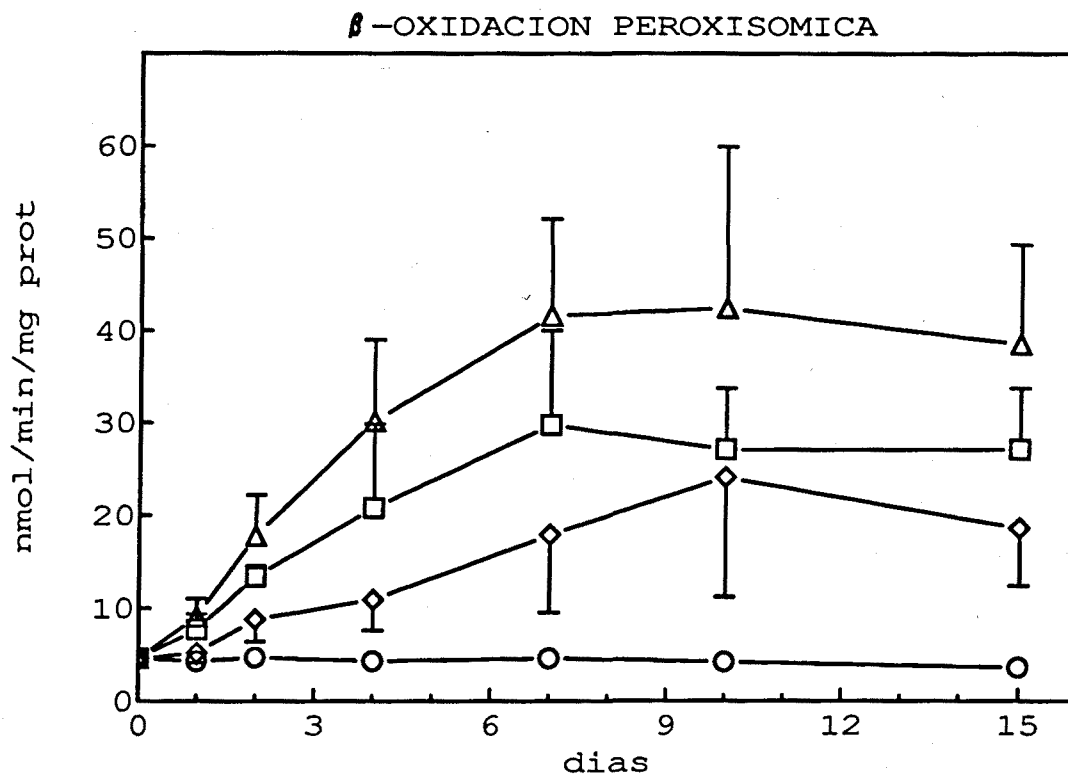


Fig. 3.2.a.  $\beta$ -oxidación peroxisómica. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos distintos, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

**Tabla 3.2.b.  $\beta$ -oxidación peroxisómica (Período II)**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
0	5.3 $\pm$ 0.7			
1	5.0 $\pm$ 0.1	8.7 $\pm$ 2.2	10.5 $\pm$ 2.2*	7.7 $\pm$ 1.4
2	5.7 $\pm$ 0.8	12.2 $\pm$ 2.3*	18.2 $\pm$ 2.7*	10.6 $\pm$ 2.2*
4	5.7 $\pm$ 0.7	18.8 $\pm$ 5.2*	34.1 $\pm$ 9.1*	15.2 $\pm$ 3.6*
7	5.4 $\pm$ 1.0	28.2 $\pm$ 8.5*	48.8 $\pm$ 6.5*	17.7 $\pm$ 4.8*
10	6.3 $\pm$ 1.4	26.6 $\pm$ 6.4*	52.5 $\pm$ 10.3*	20.7 $\pm$ 4.9*
15	5.2 $\pm$ 0.6	38.0 $\pm$ 5.8*	48.4 $\pm$ 21.4*	17.8 $\pm$ 4.5*

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=8. (\*) Valores de actividad que presentan diferencia significativa respecto al valor control del mismo día ( $p < 0.05$ ).

### **Resultados en cobaya**

La actividad  $\beta$ -oxidación peroxisómica se ha determinado en cobayas control y tratados con GFB durante 15 días, a partir de la fracción del sobrenadante de la primera centrifugación, a una concentración de 400  $\mu$ g/ml.

La actividad obtenida en cobayas tratados ( 3.31  $\pm$  0.88 nmol/min/mg de proteína) no resultó ser significativamente diferente de la obtenida en los controles ( 2.67  $\pm$  0.47 nmol/min/mg de proteína), lo que refleja la baja sensibilidad de esta especie a la proliferación peroxisómica. Los datos expuestos son la media  $\pm$  la desviación estándar de las actividades de 9 animales de cada grupo.

### **3.3. PALMITOIL-CoA HIDROLASAS**

Para determinar la actividad de las distintas palmitoil-CoA hidrolasas en rata se han utilizado las fracciones celulares donde éstas se localizan (microsomas, mitocondria y citosol), en todos los casos a una concentración de 100 µg/ml. De igual modo, se han determinado las mismas actividades en cobayas, utilizando las siguientes concentraciones proteicas: 500 µg/ml (microsomas), 400 µg/ml (mitocondrias pesadas), 75 µg/ml (mitocondrias ligeras) y 250 µg/ml (citosol).

#### **3.3.1. Palmitoil-CoA hidrolasa microsomal**

##### **Resultados en rata**

La primera observación que se desprende de la Tabla 3.3.1. es que la actividad palmitoil-CoA hidrolasa microsomal de las ratas control, no es constante sino que se incrementa de forma significativa respecto al día 0 ( $p < 0.05$ ) a partir del primer día de tratamiento. De igual modo, las actividades en ratas tratadas con GFB aumentan de forma paralela a lo largo de todo el tratamiento; en cambio, en ratas tratadas con CFB y BFB, los valores a los que se llega en el cuarto día de tratamiento se mantienen casi constantes en los días posteriores. En la Figura 3.3.1 se observa gráficamente la dualidad de comportamiento control-GFB por un lado y CFB-BFB por otro.

El orden de potencia observado para la activación de la palmitoil-CoA hidrolasa microsomal es BFB > GFB > CFB. El máximo de actividad para todos los fármacos se produce en el día 4 de tratamiento. Justamente en este día, los animales control presentan el valor más bajo de actividad. Asignando a éste un 100 %, encontramos que los animales tratados con CFB, BFB y GFB llegan a valores del 131, 162 y 153 % de actividad respectivamente. A partir de éste día, debido al aumento de los valores de actividad control, se produce una aparente pérdida de efecto para los grupos tratados con CFB y BFB,

siendo este fenómeno menos acusado en el caso del GFB.

**Tabla 3.3.1. Palmitoil-CoA hidrolasa microsomal**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	36.3 ± 5.3			
1	48.5 ± 9.4**	56.2 ± 9.7	58.6 ± 6.2	55.6 ± 5.6
2	49.1 ± 13.5**	56.5 ± 8.1	73.9 ± 11.3*	66.1 ± 13.7*
4	45.7 ± 4.8	59.7 ± 6.5*	74.3 ± 9.9*	69.8 ± 10.0*
7	55.1 ± 10.2**	69.1 ± 11.9*	78.2 ± 15.9*	75.2 ± 15.4*
10	63.9 ± 9.6**	73.3 ± 7.2	73.8 ± 16.8	80.1 ± 10.9*
15	70.4 ± 10.5**	73.3 ± 7.2	80.3 ± 9.4	85.6 ± 9.7*

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=6. (\*) Valores que presentan diferencia significativa respecto los controles del mismo día (p<0.05). (\*\*) Valores de actividad control significativamente diferentes (p<0.05) respecto al valor control del día 0.

**Figura 3.3.1.**

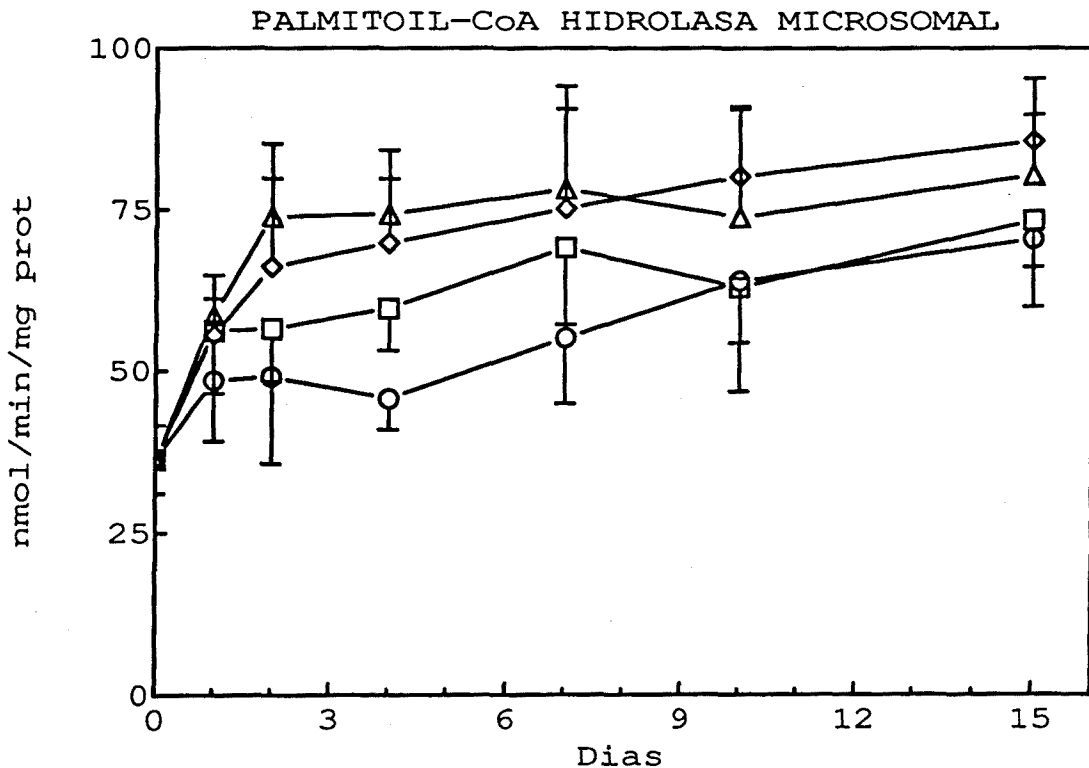


Fig. 3.3.1. Palmitoil-CoA hidrolasa microsomal. Los resultados son la media ± S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

## **Resultados en cobaya**

La palmitoil-CoA hidrolasa de microsomas de cobaya no resulta afectada por el tratamiento de los animales con GFB durante 15 días: la actividad del grupo control es de  $3.82 \pm 0.81$  nmol/min/mg de proteína, prácticamente idéntica a la obtenida en el grupo tratado ( $4.06 \pm 0.42$  nmol/min/mg de proteína). Los resultados son la media ( $\pm$  la desviación estándar) obtenida a partir de 6 animales en cada grupo. Puede observarse que la actividad palmitoil-CoA hidrolasa microsomal en cobaya es muy inferior a la registrada en rata, hecho que se repite para las restantes hidrolasas celulares valoradas (Apartados 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4).

### **3.3.2. Palmitoil-CoA hidrolasa citosólica**

#### **Resultados en rata**

La actividad palmitoil-CoA hidrolasa de citosol hepático de rata resulta enormemente inducida tras el tratamiento de ratas con CFB, BFB y GFB. El BFB ha resultado ser el fármaco más potente como inductor de este enzima, siendo los valores de actividad de las ratas tratadas con este fármaco significativamente superiores a los de las ratas control desde el primer día de tratamiento. El GFB es el fármaco de menor potencia inductora, mientras que el CFB presenta un comportamiento intermedio.

En la Tabla y Figura 3.3.2 puede observarse que el máximo de activación se produce al séptimo día de tratamiento, con unos incrementos aproximados de 4, 7 y 2 veces por encima del valor control para ratas tratadas con CFB, BFB y GFB, respectivamente. A partir del día 7 se observa una estabilización de las actividades enzimáticas de los animales tratados, y dado que la actividad en ratas control se mantiene constante durante todo el tratamiento, el porcentaje de inducción ya no aumenta.

**Tabla 3.3.2. Palmitoil-CoA hidrolasa citosólica**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	14.5 ± 4.0			
1	17.9 ± 4.0	24.7 ± 5.6	33.4 ± 11.4*	26.4 ± 11.5
2	13.2 ± 2.9	33.9 ± 10.0*	63.5 ± 17.2*	21.9 ± 5.0
4	18.4 ± 3.0	48.4 ± 8.5*	98.4 ± 23.6*	31.7 ± 6.9
7	15.2 ± 2.9	56.7 ± 9.8*	101.7 ± 20.4*	32.6 ± 8.7*
10	12.8 ± 3.0	52.9 ± 8.7*	74.7 ± 17.0*	27.7 ± 10.4*
15	12.4 ± 4.1	49.7 ± 8.8*	73.8 ± 27.7*	26.4 ± 5.8

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=6. (\*) Valores que presentan diferencia significativa respecto los controles del mismo día (p<0.05).

**Figura 3.3.2.**

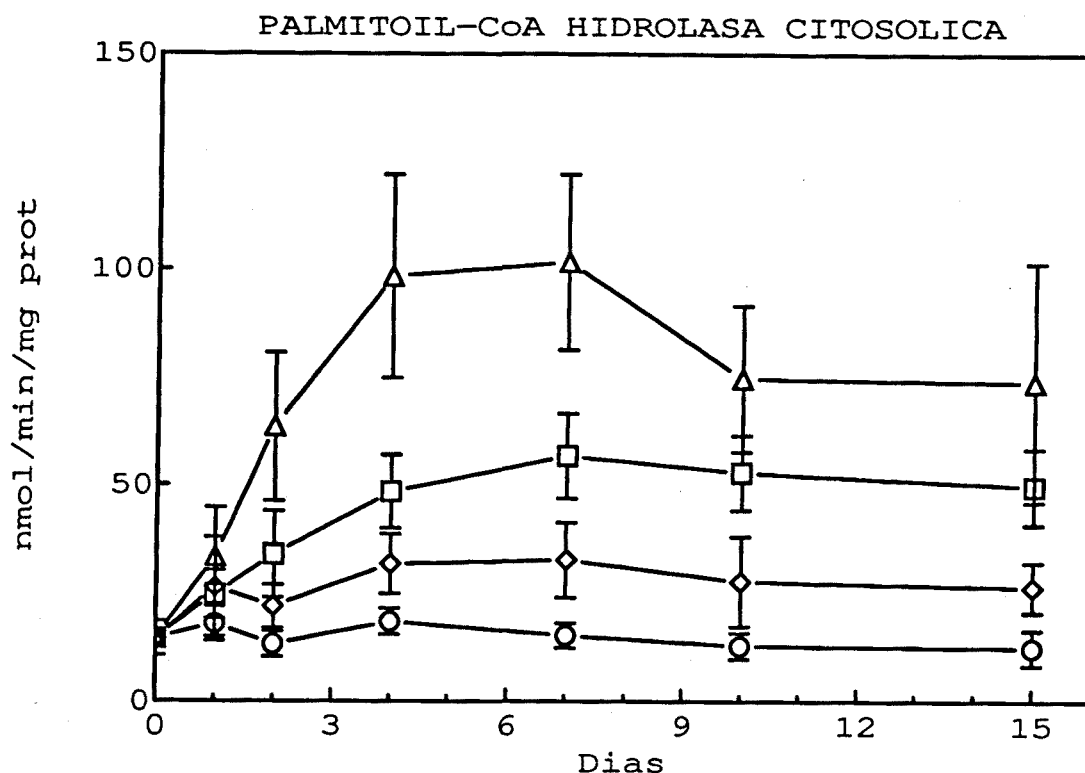


Fig 3.3.2. Palmitoil-CoA hidrolasa citosólica. Los resultados son la media ± S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

## Resultados en cobaya

El tratamiento de cobayas con GFB, al contrario de lo que sucede en rata, no es capaz de provocar la inducción de la actividad palmitoil-CoA hidrolasa citosólica. Los resultados obtenidos a partir de 6 cobayas control y 6 tratados con GFB durante 15 días han sido  $3.04 \pm 0.69$  nmol/min/mg de proteína para el grupo control y  $2.99 \pm 0.23$  nmol/min/mg de proteína para el grupo tratado.

### 3.3.3. Palmitoil-CoA hidrolasa Mitocondrial

#### Resultados en rata

Esta actividad enzimática resulta muy poco modificada tras el tratamiento de ratas con los tres derivados fibricos en estudio, de modo que, tal y como puede observarse en la Tabla 3.3.3, prácticamente no se han encontrado diferencias significativas respecto los valores de actividad control.

Tabla 3.3.3 Palmitoil-CoA hidrolasa mitocondrial

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	25.5 ± 4.1			
1	30.2 ± 6.4	36.1 ± 6.3	35.9 ± 18.8	37.4 ± 12.6
2	38.9 ± 12.5	42.9 ± 9.4	45.9 ± 11.3	46.6 ± 10.2
4	32.2 ± 7.5	37.5 ± 9.7	43.1 ± 7.6*	39.4 ± 13.0
7	34.8 ± 9.7	45.2 ± 9.2*	44.8 ± 7.4	42.7 ± 12.7
10	31.6 ± 6.2	36.8 ± 9.6	44.6 ± 10.7	40.8 ± 6.4
15	32.6 ± 6.4	32.4 ± 8.3	37.4 ± 9.4*	37.6 ± 6.5

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=6. (\*) Valores que presentan diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ).



## **Resultados en cobaya**

De forma similar a lo expuesto anteriormente para las ratas, el tratamiento de cobayas con GFB no modifica la actividad palmitoil-CoA hidrolasa de mitocondrias pesadas. Así, los resultados obtenidos (media de 6 valores  $\pm$  desviación estándar) han sido  $2.46 \pm 0.84$  y  $2.39 \pm 0.26$  nmol/min/mg de proteína para los grupos control y tratado, respectivamente.

### **3.3.4. Palmitoil-CoA hidrolasa de mitocondrias ligeras**

#### **Resultados en rata**

La primera observación que debe hacerse es que la actividad de este enzima en las ratas del grupo control aumenta a lo largo del tiempo (Tabla 3.3.4), llegando a ser un 50 % más alta que en los primeros días de tratamiento. Debido a que las actividades de las ratas tratadas son mucho más estables a lo largo del tiempo, lo que en principio parece una ligera inducción enzimática (por ejemplo, 130 % de actividad en ratas tratadas con BFB durante dos días, respecto un control del 100 %), se traduce en una disminución de la actividad enzimática en los días 10 y 15 con respecto a los valores control. Así, en el día 10 las actividades son de un 86 %, 76 % y 95 % para ratas tratadas con CFB, BFB y GFB, respectivamente, tomando el 100 % como valor control.

**Tabla 3.3.4. Palmitoil-CoA hidrolasa de mitocondrias ligeras**

<b>Día</b>	<b>Control</b>	<b>CFB</b>	<b>BFB</b>	<b>GFB</b>
0	56.0 ±17.2			
1	63.2 ±10.6	77.0 ±12.2	77.7 ±12.6	83.2 ±13.2*
2	63.2 ±11.7	72.6 ±10.2	82.3 ±15.8*	74.1 ±14.2
4	67.0 ± 9.9	71.8 ±16.6	78.3 ± 7.3	81.2 ± 8.3
7	71.3 ± 6.0	77.7 ±11.4	72.5 ±11.2	84.2 ±11.2
10	85.2 ±12.4**	64.6 ± 6.4*	69.3 ±14.0	79.2 ±15.1
15	84.3 ±17.9**	72.4 ± 4.4	64.2 ± 7.9*	80.4 ± 6.9

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=5. (\*) Valores que presentan diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ). (\*\*) Valores de actividad control significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto al valor control del día 0.

### **Resultados en cobaya**

En las mitocondrias ligeras, la actividad palmitoil-CoA hidrolasa es muy similar en cobayas control ( $8.48 \pm 3$  nmol/min/mg de proteína) y en cobayas tratadas con GFB durante 15 días ( $7.13 \pm 1.4$  nmol/min/mg de proteína). Los resultados citados se han obtenido a partir de 6 animales en cada caso.

### **3.3.5. Efecto *in vitro* de CFB, BFB Y GFB sobre la palmitoil-CoA hidrolasa citosólica de rata**

La actividad palmitoil-CoA hidrolasa se ha determinado en citosol de ratas control y tratadas en presencia de fármaco a dos concentraciones (1 y 5 mM) y los valores se han comparado con la actividad obtenida sin adicionar fármacos al medio de incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3.5.

La actividad palmitoil-CoA hidrolasa en citosol de ratas control resulta fuertemente inhibida por la adición *in vitro* de los fármacos. Estos resultados difieren de los obtenidos en citosol de cerebro de rata (Sánchez y col., 1991), donde la adición de los fármacos no produce ningún efecto.

En cuanto a las ratas tratadas con CFB y BFB se observa que la adición de fármacos al medio de reacción no modifica la actividad enzimática, mientras que en citosol de ratas tratadas con GFB, la presencia de fármaco *in vitro* resulta también inhibitoria.

**Tabla 3.3.5. Efecto *in vitro* de CFB, BFB y GFB sobre la PCH citosólica**

<b>Fármaco <i>in vitro</i></b>	<b>Cit Control</b>	<b>Cit CFB</b>	<b>Cit BFB</b>	<b>Cit GFB</b>
<b>Control</b>	11.5 ± 1.8	62.4 ± 9.6	115.6 ± 8.5	25.5 ± 5.1
<b>CFB 1 mM</b>	8.5 ± 1.2	64.4 ± 8.8	120.4 ± 5.6	25.2 ± 3.9
<b>CFB 5 mM</b>	3.6 ± 1.7	66.0 ± 6.9	122.8 ± 9.2	20.1 ± 6.0
<b>BFB 1 mM</b>	6.3 ± 4.3	69.0 ± 10.2	127.9 ± 1.0	22.4 ± 5.6
<b>BFB 5 mM</b>	1.9 ± 0.7	74.0 ± 8.3	141.9 ± 13.1	20.4 ± 5.2
<b>GFB 1 mM</b>	2.9 ± 1.8	60.6 ± 6.4	117.7 ± 5.5	18.4 ± 4.5
<b>GFB 5 mM</b>	0.6 ± 0.7	61.7 ± 6.6	117.4 ± 10.1	14.3 ± 3.3

Las actividades se expresan en nmol/min/mg de proteína. Los resultados son la media de las actividades de 3 ratas diferentes alimentadas con dieta control, y 15 ratas sometidas a tratamiento, 3 con CFB, 3 con BFB y 3 con GFB.

### **3.3.6. DIALISIS DE CITOSOL DE RATAS CONTROL Y TRATADAS CON GEMFIBROZILLO**

Dado que el GFB es el único de los tres fármacos que presenta una marcada tendencia a acumularse en el hígado, se procedió a dializar el citosol

de las ratas tratadas con este fármaco con el fin de eliminarlo, en el caso de que estuviera presente en esta fracción celular.

La diálisis de citosol hepático de ratas control y tratadas con GFB se realizó utilizando tubos Visking de 24 A de poro y límite de exclusión 8000-15000 D, durante 14 h en 2 l de Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, a 4 °C. Como puede observarse en la Tabla 3.3.6, los valores de actividad enzimática antes y después de la diálisis no se modifican, descartándose así la posibilidad de que el escaso incremento en la actividad PCH citosólica en ratas tratadas con GFB fuera debido al efecto inhibitorio debido a la acumulación del fármaco en el citosol.

**Tabla 3.3.6. PCH citosólica antes y después de diálisis**

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>ANTES DIALISIS</b>	<b>DESPUES DIALISIS</b>
CONTROL	14.9	14.6
GFB	26.7	25.0

Los valores de actividad enzimática corresponden a la media de dos determinaciones diferentes y están expresados en nmol/min/mg de proteína.

### **3.4. PALMITOIL-CoA SINTETASA**

La actividad palmitoil-CoA sintetasa se ha determinado en microsomas de rata a una concentración de 200 µg/ml, y en microsomas de cobaya a razón de 400 µg de proteína microsomal/ml.

## Resultados en rata

En la Tabla y Figura 3.4 puede apreciarse que el tratamiento con fibratos produce un importante incremento en la actividad de este enzima, incremento que es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) desde el cuarto día de tratamiento con CFB y BFB y a partir del séptimo día en el caso del grupo tratado con GFB. El orden de potencia inductora es  $BFB > CFB > GFB$ , y para los tres grupos el máximo de inducción se produce en el día 7 del tratamiento. La ligera disminución de las actividades que se observa en el día 10 de tratamiento no parece tener importancia, ya que éstas se recuperan en el día 15.

Tabla 3.4. Palmitoil-CoA sintetasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	208.3 ± 75.3			
1	219.3 ± 34.7	245.3 ± 54.8	266.8 ± 15.3	207.2 ± 58.4
2	216.7 ± 52.9	283.1 ± 55.1	288.8 ± 49.4	269.2 ± 91.4
4	240.1 ± 94.3	418.7 ± 83.2*	443.5 ± 66.3*	343.5 ± 91.4
7	231.9 ± 32.9	453.4 ± 91.4*	578.1 ± 117.6*	404.8 ± 79.6*
10	251.0 ± 54.6	449.1 ± 102.7*	428.1 ± 171.8*	349.5 ± 53.8*
15	229.1 ± 25.9	490.3 ± 69.9*	586.6 ± 30.9*	414.4 ± 50.9*

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para  $n=6$ . (\*) Valores que presentan diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p < 0.05$ ). (\*\*) Valores de actividad control significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto al valor control del día 0.

**Figura 3.4**

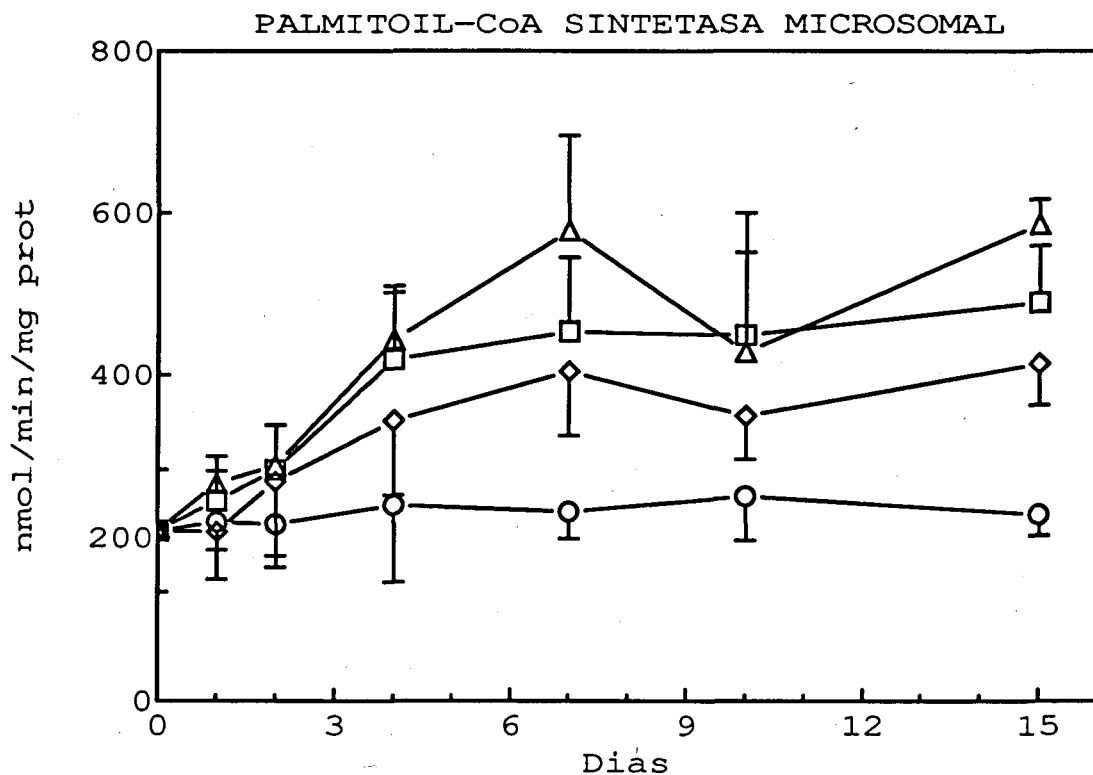


Fig. 3.4. Palmitoil-CoA sintetasa. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□) CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

### Resultados en cobaya

A diferencia de lo sucedido en rata, la actividad palmitoil-CoA sintetasa resulta inalterada tras el tratamiento de cobayas con GFB. Los resultados obtenidos a partir de 6 cobayas control y 6 sometidos a dieta conteniendo un 0.3 % p/p de GFB, han sido:  $61.3 \pm 12.2$  nmol/min/mg para los controles y  $65.4 \pm 12.4$  nmol/min/mg de proteína para los tratados.

### 3.5. SISTEMAS DE ELONGACION MICROSOMAL

#### 3.5.1. Palmitoil-CoA elongasa

##### Resultados en rata

Los tres fármacos ensayados, CFB, BFB y GFB, producen una inducción significativa de la actividad palmitoil-CoA elongasa, prácticamente desde el inicio del tratamiento. El orden de potencia inductora es BFB=GFB>-CFB. Aunque BFB y GFB producen un incremento de similar magnitud en esta actividad enzimática (máximo alrededor del 290 % en los días 10 y 15, tomando el 100 % como valor control), el efecto inductivo del GFB se presenta de forma mucho más temprana (la diferencia es significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al control desde el primer día de tratamiento). El CFB ha resultado ser el de menor potencia inductiva: máxima actividad de un 125 % respecto a un control del 100 %. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla y Figura 3.5.1 .

Tabla 3.5.1. Palmitoil-CoA elongasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	0.93 ± 0.42			
1	0.70 ± 0.27	0.69 ± 0.24	0.96 ± 0.53	1.43 ± 0.74*
2	0.61 ± 0.12	1.15 ± 0.17*	1.37 ± 0.27*	1.70 ± 0.59*
4	0.59 ± 0.32	1.34 ± 0.69*	2.12 ± 0.83*	1.96 ± 0.61*
7	0.63 ± 0.22	1.09 ± 0.06	1.93 ± 0.41*	2.15 ± 0.44*
10	0.55 ± 0.14	1.23 ± 0.33*	2.15 ± 0.47*	1.76 ± 0.46*
15	0.58 ± 0.17	1.10 ± 0.34*	1.82 ± 0.62*	2.05 ± 0.77*

Las actividades están expresadas en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponden a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control del mismo día.

**Figura 3.5.1.**

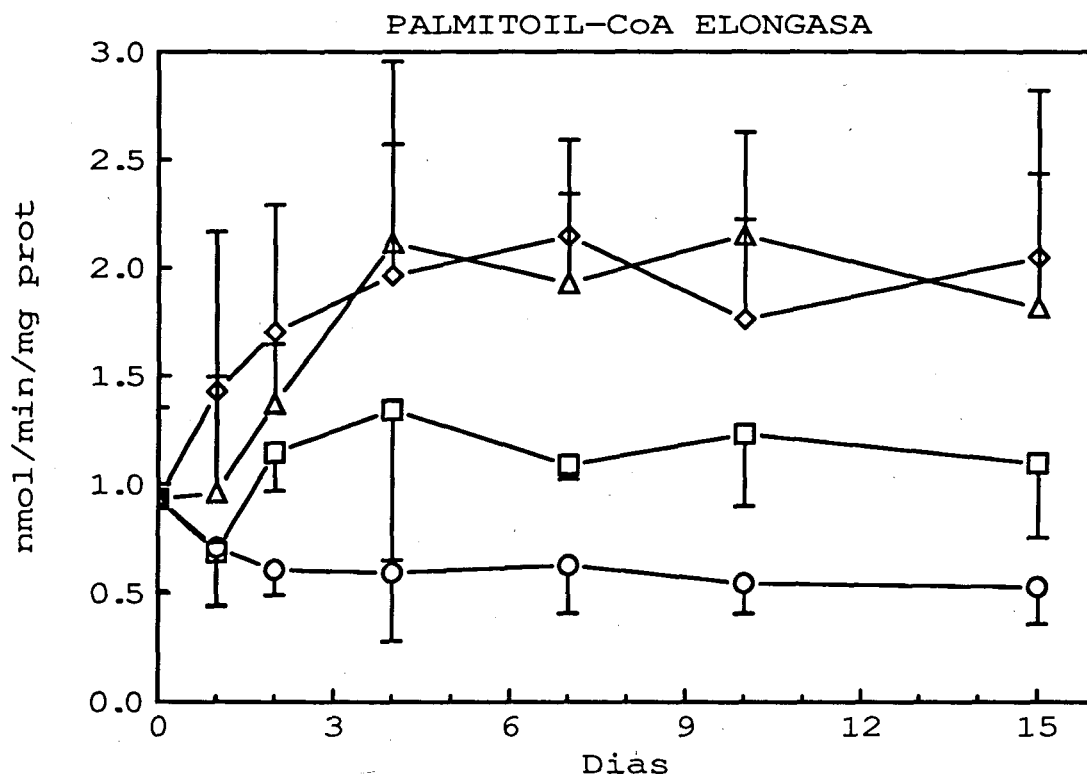


Fig. 3.5.1. Palmitoil-CoA elongasa. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (Δ)BFB, (◊)GFB.

### Resultados en cobaya

La actividad palmitoil-CoA elongasa ha resultado inducida de manera significativa en cobayas tratados con GFB durante 15 días. Las actividades medias ( $\pm$  desviación estándar) obtenidas a partir de 6 animales son de  $0.73 \pm 0.23$  nmol/min/mg de proteína para los controles y de  $1.13 \pm 0.23$  nmol/min/mg de proteína para los tratados con GFB.



### **3.5.2. Palmitoleoil-CoA elongasa**

#### **Resultados en rata**

La actividad elongasa microsomal con sustratos monoinsaturados ha resultado menos afectada por el tratamiento con fibratos que en el caso de los sustratos saturados. Así, el GFB ha resultado ser el único de los tres fibratos ensayados capaz de producir un incremento significativo y constante de la actividad palmitoleoil-CoA elongasa en rata, desde el segundo día hasta el final del tratamiento. En cambio, en ratas tratadas con BFB, aunque se presenta una tendencia hacia el incremento de esta actividad enzimática, los resultados obtenidos rara vez alcanzan significación estadística. El CFB ha mostrado ser incluso menos efectivo que el BFB respecto a la modificación de la palmitoleoil-CoA elongasa. Los resultados se muestran en la Tabla y Figura 3.5.2.

#### **Resultados en cobaya**

La actividad palmitoleoil-CoA elongasa se incrementa de manera significativa en cobayas tratados durante 15 días con GFB. Los resultados obtenidos a partir de 6 cobayas control y 6 tratados (media  $\pm$  desviación estándar) han sido  $0.79 \pm 0.15$  y  $1.14 \pm 0.17$  nmol/min/mg de proteína microsomal.

**Tabla 3.5.2. Palmitoleoil-CoA elongasa**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	1.87 ± 0.65			
1	1.68 ± 0.36	1.63 ± 0.46	1.70 ± 0.62	2.23 ± 0.66
2	1.61 ± 0.43	1.96 ± 0.68	1.63 ± 0.56	2.30 ± 0.42*
4	1.36 ± 0.60	1.92 ± 0.90	2.26 ± 0.74*	2.53 ± 0.76*
7	1.45 ± 0.43	1.63 ± 0.27	2.05 ± 0.61	2.23 ± 0.51
10	1.68 ± 0.47	1.72 ± 0.45	2.43 ± 0.75*	2.41 ± 0.76*
15	1.73 ± 0.45	1.84 ± 0.50	2.01 ± 0.55	2.44 ± 0.67*

Las actividades están expresadas en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponden a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas (p<0.05) respecto al control del mismo día.

**Figura 3.5.2.**

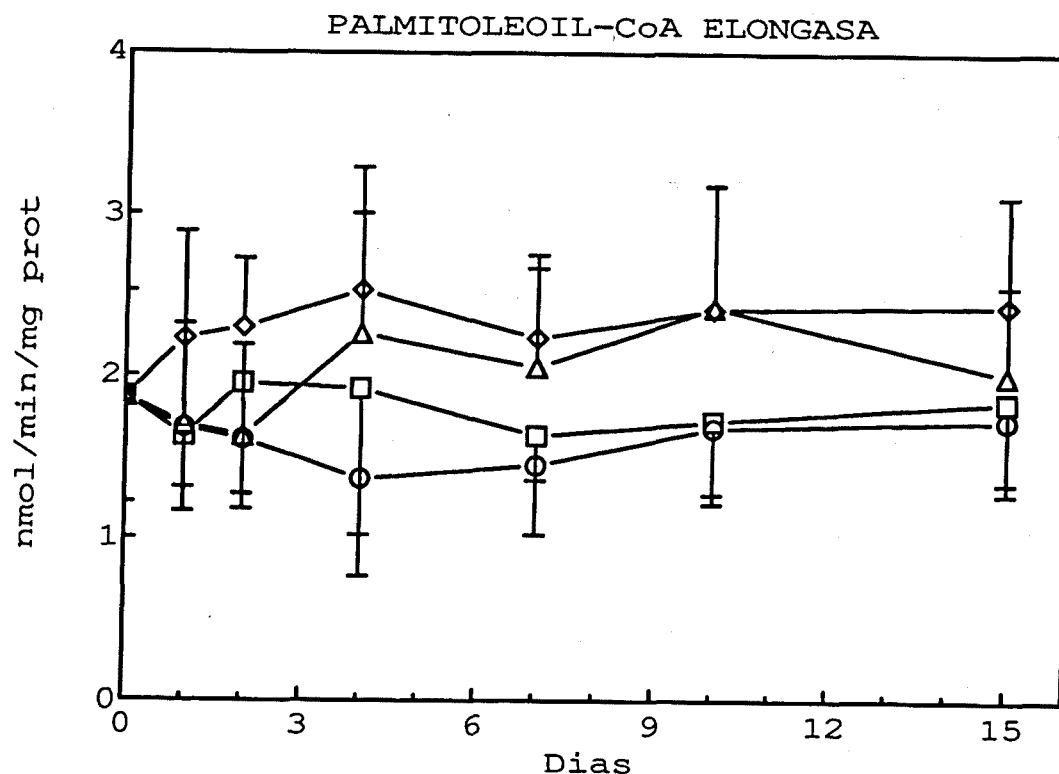


Fig. 3.5.2. Palmitoleoil-CoA elongasa. Los resultados son la media ± S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

### 3.5.3. Gamma-linolenil-CoA elongasa

#### Resultados en rata

Al determinar la elongación microsomal en rata utilizando un sustrato poliinsaturado, como el gamma-linolenil-CoA, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos tratados, ya sea con CFB, BFB o GFB. Los resultados pueden observarse en la Tabla

Tabla 3.5.3. Gamma-linolenil-CoA elongasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	2.19 ± 0.71			
1	1.96 ± 0.68	1.79 ± 0.59	1.95 ± 0.77	2.30 ± 0.76
2	1.90 ± 0.28	2.08 ± 0.49	1.82 ± 0.46	2.03 ± 0.50
4	1.78 ± 0.96	2.10 ± 1.02	2.18 ± 0.79	2.54 ± 0.85*
7	1.77 ± 0.53	1.86 ± 0.32	2.25 ± 0.45	2.22 ± 0.53
10	2.34 ± 0.44	1.97 ± 0.31	2.78 ± 0.67	2.59 ± 0.58
15	2.29 ± 0.42	1.94 ± 0.49	2.33 ± 0.44	2.43 ± 0.51

Las actividades están expresadas en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponden a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control del mismo día.

#### Resultados en cobaya

A diferencia de lo sucedido en rata, la elongación de gamma-linolenil-CoA sufre una inducción significativa en cobayas tratados durante 15 días con GFB ( $0.70 \pm 0.14$  nmol/min/mg de proteína) respecto a los controles ( $0.53 \pm$

0.11 nmol/min/mg de proteína). Las actividades han sido calculadas según la media obtenida a partir de 6 cobayas de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

### **3.6. SISTEMAS DE DESATURACION MICROSOMAL**

#### **3.6.1. Delta-9 desaturasa**

##### **Resultados en rata**

La actividad delta-9 desaturasa sufre un notable incremento en las ratas tratadas con los tres derivados fíbricos en estudio Tabla y Figura 3.6.1. Las diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) desde el primer día de tratamiento en el caso del GFB, a partir del segundo día para el BFB y después del día 4 en el caso del CFB. Cabe destacar que, a pesar de que el GFB es el que tiene una acción más inmediata (desde el día 1 ya es significativo), las actividades permanecen constantes para este grupo a lo largo del tratamiento, de forma que a partir del día 4, a los valores obtenidos son similares a los del grupo tratado con CFB. El más potente como inductor de la delta-9 desaturasa ha sido, sin embargo, el BFB, llegando a ser la actividad delta-9 desaturasa de las ratas tratadas con este fármaco hasta 3 veces mayor que la del grupo control. La máxima inducción de este enzima se ha registrado en el séptimo día de tratamiento (actividades de 234, 297 y 241 % para ratas tratadas con CFB, BFB y GFB, respectivamente, tomando el 100 % como valor control).

**Tabla 3.6.1. Delta 9 desaturasa**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	1.42 ± 0.76			
1	1.40 ± 0.65	1.36 ± 0.41	1.53 ± 0.37	2.28 ± 0.94*
2	1.35 ± 0.54	2.04 ± 0.49	2.30 ± 0.46*	2.20 ± 0.57*
4	1.69 ± 0.73	2.55 ± 0.64*	2.83 ± 0.47*	2.34 ± 0.44
7	1.02 ± 0.46	2.39 ± 0.71*	3.03 ± 0.68*	2.46 ± 0.93*
10	1.32 ± 0.49	3.01 ± 0.49*	3.49 ± 0.37*	2.55 ± 0.49*
15	1.34 ± 0.23	2.63 ± 0.36*	3.21 ± 0.40*	2.73 ± 1.02*

Las actividades están expresadas en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponden a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas (p<0.05) respecto al control del mismo día.

**Figura 3.6.1.**

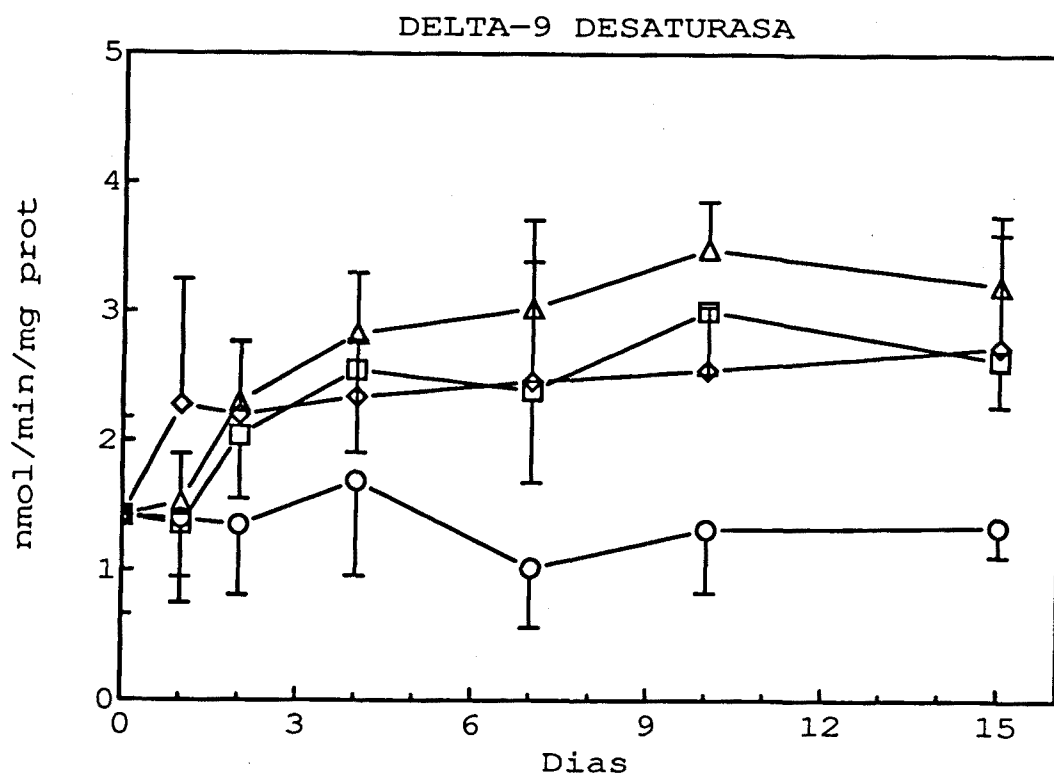


Fig. 3.6.1. Delta-9 desaturasa. Los resultados son la media ± S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

## **Resultados en cobaya**

La delta-9 desaturasa es la única de los tres sistemas de desaturación ensayados para la que se han obtenido actividades apreciables en cobaya. Aunque los resultados obtenidos a partir de 6 animales reflejan una tendencia hacia la inhibición de esta actividad enzimática ( $0.148 \pm 0.097$  nmol/min/mg de proteína en cobayas control y  $0.084 \pm 0.047$  en cobayas tratados con GFB durante 15 días) las altas desviaciones estándar obtenidas anulan la significación estadística. La magnitud de las desviaciones puede ser debida a las bajas actividades obtenidas para este enzima en cobaya, que dificultan enormemente su detección en esta especie.

### **3.6.2. Delta-5 desaturasa**

#### **Resultados en rata**

La actividad delta-5 desaturasa en rata presenta un comportamiento muy similar al descrito para la delta-9 respecto al tratamiento con CFB, BFB y GFB. Así, el orden de potencia de inducción de la actividad delta-5 desaturasa es  $BFB > CFB = GFB$ . Los incrementos son significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control a partir del día 2 para los tres grupos de tratamiento. Al igual que en el caso de la Delta-9 desaturasa, es el tratamiento con BFB el que produce mayor inducción, mientras que las ratas tratadas con CFB y GFB, presentan actividades parecidas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla y Figura 3.6.2.

#### **Resultados en cobaya**

La actividad delta-5 desaturasa en cobaya ha sido no detectable en nuestras condiciones de trabajo tanto en animales control como en tratados, por lo que podemos descartar que el tratamiento con GFB produzca una

inducción lo suficientemente importante de esta actividad enzimática.

**Tabla 3.6.2. Delta-5 desaturasa**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	1.06 ± 0.53			
1	0.94 ± 0.2	1.09 ± 0.47	1.20 ± 0.41	1.07 ± 0.27
2	1.11 ± 0.4	1.52 ± 0.21	2.02 ± 0.63*	1.69 ± 0.58*
4	0.98 ± 0.25	1.88 ± 0.25*	2.44 ± 0.64*	2.16 ± 0.30*
7	0.88 ± 0.26	1.63 ± 0.44*	2.20 ± 0.64*	1.76 ± 0.64*
10	0.82 ± 0.36	1.43 ± 0.50*	2.40 ± 0.74*	1.86 ± 0.40*
15	0.77 ± 0.21	1.82 ± 0.42*	2.32 ± 0.55*	1.15 ± 0.75

Las actividades están expresadas en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponden a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas (p<0.05) respecto al control del mismo día.

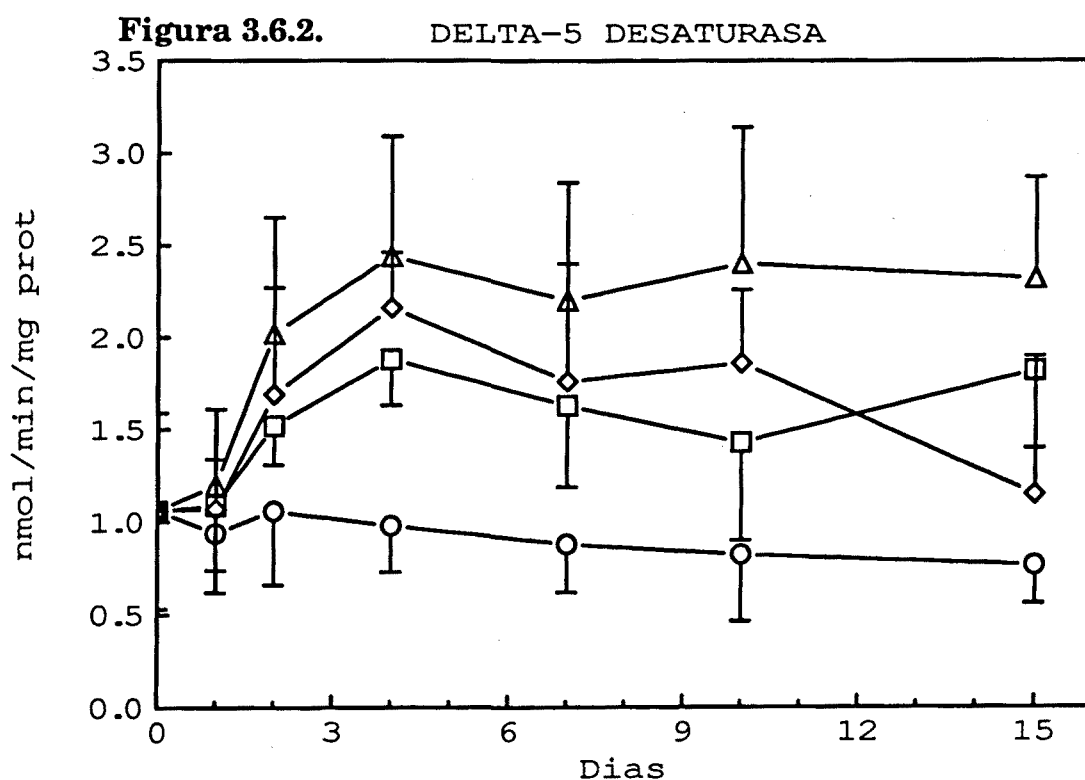


Fig. 3.6.2. Delta-5 desaturasa. Los resultados son la media ± S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

### 3.6.3. Delta-6 desaturasa

#### Resultados en rata

La actividad delta-6 desaturasa también se induce de forma significativa tras el tratamiento de ratas con fibratos, pero, a diferencia de lo que sucede en las otras dos desaturasas estudiadas, el orden de potencia inductora es GFB>BFB=CFB. El fármaco más potente para este efecto es, pues, el GFB, presentando los animales tratados con este fármaco actividades significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) respecto al control desde el primer día de tratamiento. El máximo efecto del GFB (aproximadamente un 275 % de activación, respecto a un control del 100 %) se produce al cabo de 10 días de tratamiento. En los casos de CFB y BFB se obtienen aumentos de la actividad enzimática más moderados respecto al control, que son estadísticamente significativos a partir del día 4. Cabe destacar que la actividad delta-6 desaturasa en ratas control disminuye de manera progresiva a lo largo del tiempo. Los resultados se presentan en la tabla y figura 3.6.3.

Tabla 3.6.3. Delta-6 desaturasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	0.23 ± 0.11			
1	0.21 ± 0.11	0.31 ± 0.08	0.28 ± 0.13	0.40 ± 0.25*
2	0.28 ± 0.13	0.34 ± 0.15	0.38 ± 0.13	0.53 ± 0.26*
4	0.16 ± 0.05	0.37 ± 0.24*	0.43 ± 0.12*	0.57 ± 0.18*
7	0.21 ± 0.12	0.32 ± 0.13	0.32 ± 0.11	0.47 ± 0.24*
10	0.12 ± 0.06	0.36 ± 0.06*	0.37 ± 0.16*	0.46 ± 0.27*
15	0.10 ± 0.06**	0.39 ± 0.07*	0.34 ± 0.07*	0.32 ± 0.14*

La actividad está expresada en nmoles/min/mg de proteína microsomal, y corresponde a la media ± la desviación estándar para n=6. (\*) Valores que presentan diferencias significativas ( $p<0.05$ ) respecto al control del mismo día (\*\*) Valores control que presentan una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) respecto al control del día 0.



**Figura 3.6.3.**

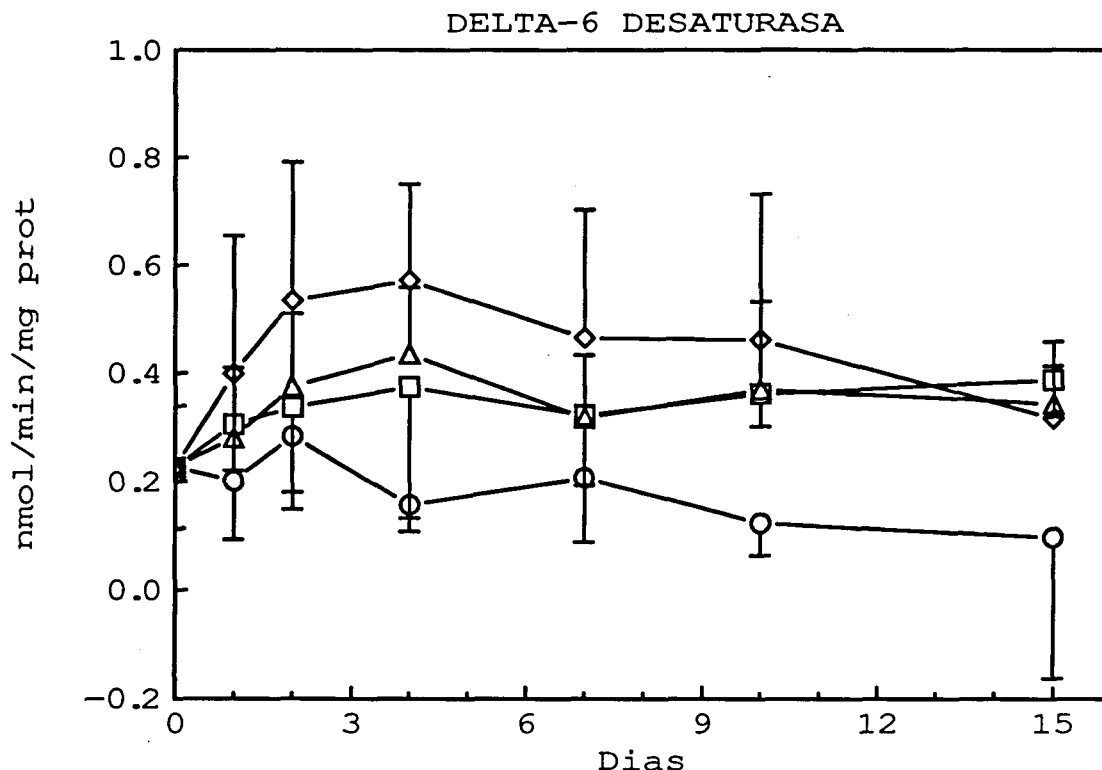


Fig. 3.6.3. Delta-6 desaturasa. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (Δ)BFB, (◇)GFB.

### Resultados en cobaya

De igual manera a lo expuesto para la delta-5 desaturasa, la actividad delta-6 es indetectable, en nuestras condiciones de trabajo, tanto en cobayas control como en tratados con GFB, de modo que no parece existir ningún efecto estimulador importante de este fármaco sobre esta actividad enzimática.

### 3.7. CADENAS DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL

En todos los casos, en rata y en cobaya, se ha utilizado para la valoración de las actividades enzimáticas correspondientes a las cadenas de transporte electrónico la fracción microsomal hepática a una concentración de 100  $\mu$ g/ml.

### 3.7.1. NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa

#### Resultados en rata

Como puede observarse en la Tabla 3.7.1, la actividad NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa no resulta modificada por el tratamiento de ratas con ninguno de los tres fármacos en estudio.

Tabla 3.7.1. NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	2.8 ± 0.9			
1	3.1 ± 0.5	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.9 ± 0.4
2	3.2 ± 1.1	2.8 ± 0.6	2.6 ± 0.6	2.9 ± 0.6
4	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.1 ± 0.7
7	3.2 ± 1.0	3.2 ± 0.7	3.6 ± 1.4	3.4 ± 1.4
10	3.4 ± 0.9	3.4 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.3 ± 0.7
15	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.5	3.5 ± 0.5

Actividades expresadas en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para n=6.

La actividad NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa no se ha valorado en cobaya dado que no ha resultado modificada en rata.

### 3.7.2. NADH citocromo c reductasa

#### Resultados en rata

La actividad NADH citocromo c reductasa resulta inhibida de manera muy significativa respecto al control después del tratamiento de las ratas con CFB y BFB ( $p < 0.05$  a partir del día 2, exceptuando el día 7). En cambio, el GFB, aunque resulta también inhibidor de esta actividad enzimática, lo es en

menor grado. Así, los valores obtenidos en ratas tratadas con GFB en ningún momento resultan estadísticamente distintos a los controles, y como máximo representan un 80 % respecto un control del 100 %. En cambio, la actividad NADH citocromo c reductasa para ratas tratadas con CFB y BFB llega a valores que corresponden entre el 55 i el 65 % de los valores control.

En la Figura 3.7.2. se aprecia el comportamiento inhibitorio de los tres fármacos; se observa una ruptura de la tendencia inhibitoria en el día 7 del tratamiento, recuperándose ésta en días posteriores.

**Tabla 3.7.2. NADH citocromo c reductasa**

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	1.00 ± 0.3			
1	0.84 ± 0.2	0.68 ± 0.2	0.58 ± 0.2	0.75 ± 0.1
2	0.92 ± 0.3	0.58 ± 0.1*	0.52 ± 0.1*	0.92 ± 0.3
4	0.92 ± 0.2	0.60 ± 0.09*	0.48 ± 0.1*	0.80 ± 0.2
7	0.98 ± 0.3	0.81 ± 0.5	0.79 ± 0.4	1.00 ± 0.4
10	1.02 ± 0.2	0.63 ± 0.1*	0.65 ± 0.1*	0.84 ± 0.08
15	0.98 ± 0.2	0.80 ± 0.1	0.68 ± 0.2*	0.87 ± 0.2

Actividades expresadas en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para  $n=6$ . (\*) Valores de actividad que presentan una diferencia significativa respecto los controles del mismo día ( $p<0.05$ ).

**Figura 3.7.2. NADH CITOCROMO C REDUCTASA**

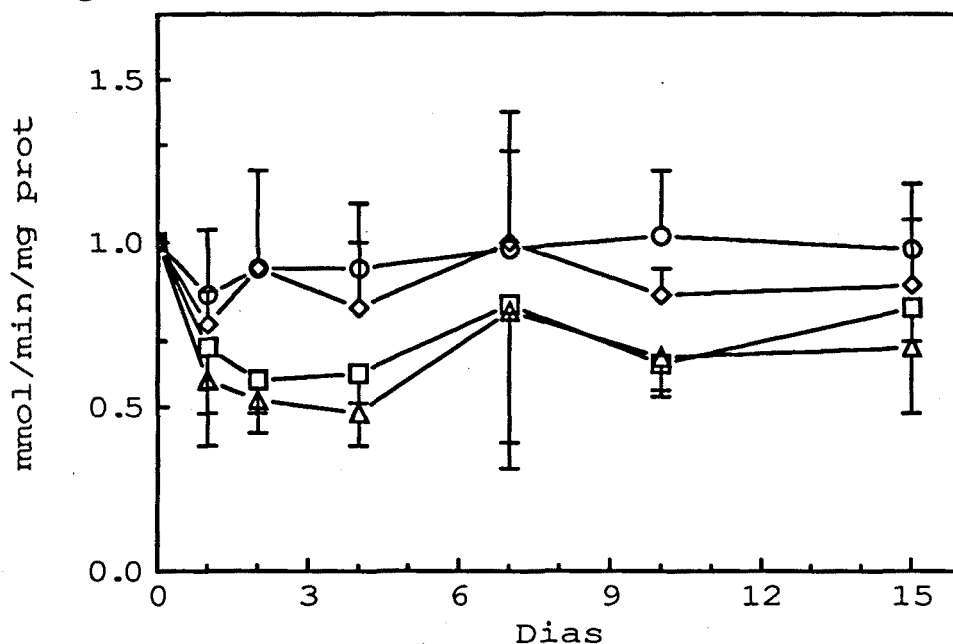


Fig. 3.7.2. NADH citocromo c reductasa. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

### Resultados en cobaya

La actividad NADH citocromo c reductasa en cobaya parece responder de forma similar al tratamiento con fibratos en el caso de las ratas, registrándose una ligera disminución de esta actividad tras la administración de GFB durante 15 días. Así, la actividad (obtenida a partir de 6 animales de cada grupo) es de  $1.00 \pm 0.26$  mmol/min/mg de proteína en los controles y de  $0.74 \pm 0.24$  mmol/min/mg de proteína en los tratados. Sin embargo, la diferencia no ha resultado ser estadísticamente significativa.

### 3.7.3. NADPH citocromo c reductasa

#### Resultados en rata

La actividad NADPH citocromo c reductasa se incrementa notablemente tras el tratamiento de ratas con los tres fármacos utilizados, siendo el orden de potencia BFB>CFB=GFB. En la Tabla 3.7.3 puede observarse que la inducción de la actividad enzimática es significativamente diferente de la actividad control ( $p<0.05$ ) a partir del segundo (BFB) o cuarto día de tratamiento (CFB y GFB). El máximo de activación se produce en el séptimo día de tratamiento con los tres fármacos, como se aprecia en la Figura 3.7.3.

Tabla 3.7.3. NADPH citocromo c reductasa

Día	Control	CFB	BFB	GFB
0	136.8 ± 40.9			
1	153.6 ± 15.7	183.3 ± 27.8	189.6 ± 25.7	139.4 ± 17.1
2	145.5 ± 47.1	189.1 ± 49.1	241.7 ± 55.0*	216.8 ± 83.5
4	171.5 ± 47.1	250.4 ± 52.6*	277.6 ± 61.9*	248.7 ± 49.4*
7	139.3 ± 44.0	282.9 ± 103.8*	328.7 ± 147.2*	267.5 ± 102.2*
10	155.2 ± 26.8	202.0 ± 51.2	218.4 ± 45.1	287.5 ± 97.1*
15	151.8 ± 56.2	271.2 ± 65.8*	272.4 ± 93.0*	283.7 ± 108.9*

Actividades expresadas en nmol/min/mg de proteína, para n=6. (\*) Valores de actividad significativamente diferentes respecto los controles del mismo día ( $p<0.05$ ).

**Figura 3.7.3.**

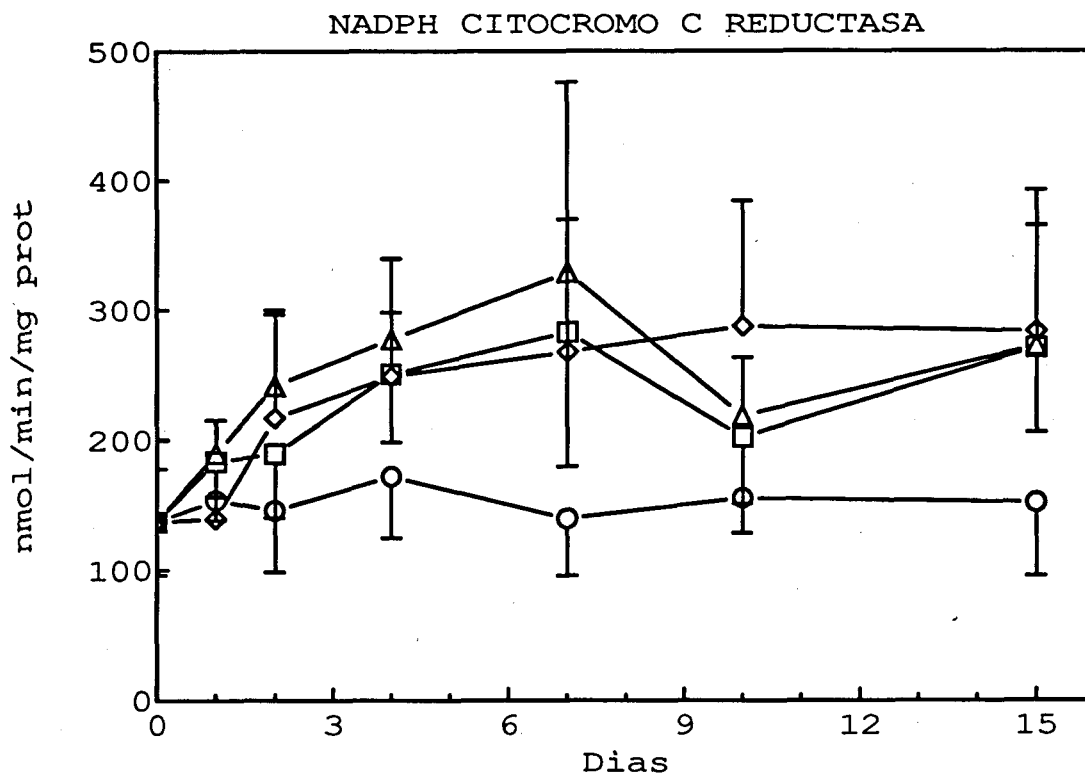


Fig. 3.7.3. NADPH citocromo c reductasa. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 6 experimentos diferentes, y están expresados en nmol/min/mg prot. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

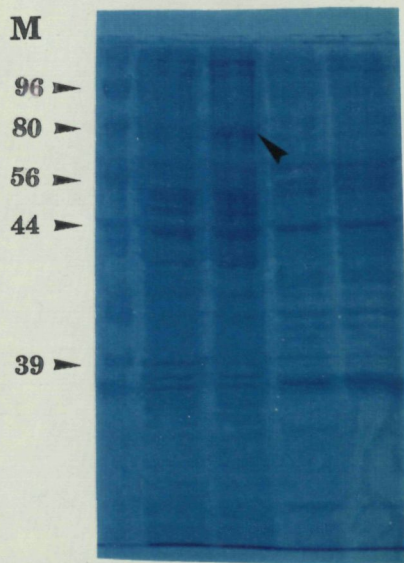
### Resultados en cobaya

A diferencia de lo que sucede en rata, la actividad NADPH citocromo c reductasa no resulta afectada por el tratamiento de cobayas con GFB. Así, tras 15 días de tratamiento con este fármaco, la actividad media, obtenida a partir de 6 cobayas, es de  $206.7 \pm 64.1$  nmol/min/mg de proteína, mientras que la media de actividades de los 6 animales control es de  $214.8 \pm 27.1$  nmol/min/mg de proteína.



#### 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para comprobar que el efecto de proliferación peroxisómica tras la administración de fibratos se produce en rata pero no en cobaya, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida del sobrenadante procedente de la centrifugación a 700 g del homogenado hepático procedente de ratas control y tratadas con GFB, y de cobayas control y tratados con GFB, en ambos casos durante 15 días. Se considera que la proteína asociada a la proliferación peroxisómica es el llamado enzima bifuncional (enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) del sistema de  $\beta$ -oxidación peroxisómica (Itoga y col., 1990). El contenido en enzima bifuncional, de un peso molecular de 78 kD (Watanabe y col., 1992), aparece claramente incrementado en la calle 2, correspondiente al sobrenadante obtenido de hígado de ratas tratadas con GFB, en comparación con la calle 1 (ratas control). Asimismo, puede observarse, comparando las calles 3 y 4, que el tratamiento con GFB durante 15 días no produce en cobaya incremento apreciable en la cantidad de enzima bifuncional peroxisómico.



Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida del sobrenadante de la centrifugación a 700 g del homogenado hepático de (2) ratas control; (3) ratas tratadas con GFB 15 días; (4) cobayas control; (5) cobayas tratados con GFB 15 días; M: marcadores de peso molecular:  $\beta$ -galactosidasa (116 kD), fructosa-6P-cinasa (96 kD), piruvato cinasa (80kD), ovoalbúmina (56 kD), láctico deshidrogenasa (44 kD), triosefosfato isomerasa (39 kD). La flecha indica la proteína bifuncional (78 kD).



