

EFEECTO DEL BEZAFIBRATO SOBRE

EL METABOLISMO LIPIDICO

T-145

UNIVERSIDAD DE FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

"EFECTO DEL BEZAFIBRATO SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO"

Directores de la Tesina:

-Dr. D. Alberto Machado
de la Quintana.

-Dra. D^a Isabel Fabregat
Romero

Memoria que presenta Cris-
tina Villanueva Ruiz-Mateos
para optar al Grado de Li-
cenciada en Farmacia.

Sevilla, Julio de 1986

D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Sevilla, y D^a ISABEL FABREGAT ROMERO, Profesora Adjunto Interino del mismo Departamento,

CERTIFICAN: Que la Tesina de Licenciatura "EFECTO DEL BEZAFIBRATO SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO" ha sido realizada en dicho Departamento bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Vº Bº Jefe Departamento

Fdo. Prof. Dr. D. Alberto

Machado

Fdo. Dra. Isabel

Fabregat

Fdo. Prof. Dr. José

Bolufer

A MIS PADRES

Quiero expresar mi profunda gratitud al Profesor Alberto Machado por haberme posibilitado la realización de este trabajo y por su dedicación en la tarea de dirección.

Mi especial agradecimiento a Elisa y Antonio por su ayuda y colaboración en la realización experimental.

Agradezco a Juan, Berta y Martiniano su inestimable ayuda en los últimos momentos.

A la Dra. Josefina Cano, Consuelo, Enrique, Antonio José y a todos los compañeros del Departamento que han contribuido a crear un ambiente agradable durante este tiempo.

A Mercedes, Javier, Benito y a todos mis compañeros del Servicio de Farmacia del Hospital Virgen del Rocío por su constante estímulo.

A mi familia, y en especial a mi hermana Manme por su contribución en la mecanografía del texto.

Y, muy especialmente, a la Dra. Isabel Fabregat por su tarea de dirección, su estímulo y ayudas constantes, y su enorme capacidad de trabajo.

ABREVIATURAS

ACP	Proteína portadora de acilos
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
dpm	Desintegraciones por minuto
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NAD	Nicotín-adenín-dinucleótido
NADP	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato reducido
PPO	2,5-difenil oxazol
PSA	Productos solubles en ácido
S.E.M.	Error estándar de la media
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INDICE

	<u>PAGINA</u>
<u>INTRODUCCION</u>	1
1. <u>PARTE TEORICA</u>	7
1.1. Transporte de lípidos en sangre y acción del beza- fibrato en las hiperlipoproteinemias.....	8
1.2. Regulación del metabolismo lipídico.....	13
1.2.1. Regulación de la biosíntesis de ácidos gra- sos.....	13
1.2.1.1. Principales etapas del proceso....	13
1.2.1.2. Regulación.....	15
1.2.2. Regulación de la β -oxidación de ácidos gra- sos.....	17
1.2.2.1. β -oxidación en mitocondrias.....	17
1.2.2.2. β - oxidación en peroxisomas.....	19
1.2.2.3. Regulación.....	23
2. <u>PLAN DE TRABAJO</u>	26
3. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	29
3.1. Material.....	30
3.1.1. Animales de experimentación.....	30
3.1.2. Medios instrumentales.....	30
3.1.3. Productos.....	31
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Situación nutricional de las ratas.....	33
3.2.2. Control del período de lactancia.....	33

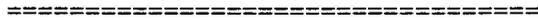
3.2.3. Tratamiento de las ratas.....	34
3.2.4. Obtención de albúmina libre de ácidos gra- sos.....	34
3.2.5. Obtención de adipocitos.....	34
3.2.6. Incubación de adipocitos.....	36
3.2.7. Obtención de hepatocitos.....	36
3.2.8. Incubación de hepatocitos.....	39
3.2.9. Obtención de acini de glándula mamaria.....	40
3.2.10. Incubación de los acini.....	41
3.2.11. Determinación de $^{14}\text{CO}_2$	42
3.2.12. Incorporación de glucosa marcada en trigli- céridos y ácidos grasos.....	43
3.2.13. Estudio de la β -oxidación de ácidos grasos	45
3.2.14. Expresión de resultados.....	48

4. RESUTADOS

4.1. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la sínte- sis de ácidos grasos, triglicéridos y la formación de CO_2 en hepatocitos aislados de rata.....	50
4.2. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la β -oxida- ción de ácidos grasos en hepatocitos aislados de rata.....	55
4.3. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la sínte- sis de ácidos grasos, triglicéridos y la formación de CO_2 en adipocitos aislados de rata.....	59

4.4. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y la formación de CO ₂ en acini de glándula mamaria de rata.....	62
4.5. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y la formación de CO ₂ en hepatocitos aislados de rata.....	66
4.6. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y la formación de CO ₂ en adipocitos aislados de rata.....	68
4.7. Efecto "in vivo" del tratamiento con bezafibrato sobre la β-oxidación de ácidos grasos en hepatocitos aislados de rata.....	70
5. <u>DISCUSION</u>	73
5.1. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre el metabolismo lipídico.....	74
5.2. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre el metabolismo lipídico.....	78
6. <u>CONCLUSIONES</u>	81
7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	84

I N T R O D U C C I O N



INTRODUCCION

La prevención primaria de la enfermedad cardíaca coronaria sobre la base de factores de riesgos conocidos y detectables forma hoy en día una parte muy importante de todo servicio de salud moderno. Junto al consumo de cigarrillos y la hipertensión, los niveles elevados de lípidos en sangre son de especial importancia para el desarrollo temprano y acelerado de la enfermedad cardíaca coronaria (Greten y col., 1980).

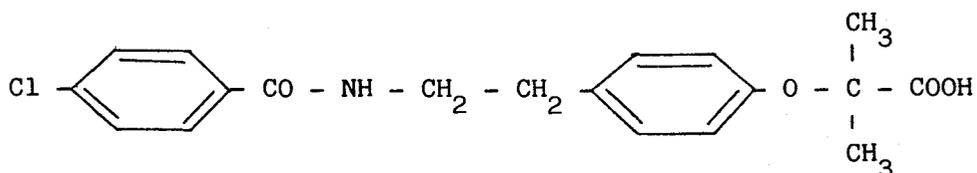
Hay pues un interés considerable en encontrar nuevos fármacos capaces de disminuir los niveles de lípidos séricos de forma específica y segura. Para la evaluación de nuevos compuestos sería de gran ayuda saber tanto como sea posible sobre el mecanismo de acción de los fármacos existentes.

El bezafibrato es uno de los principales fármacos utilizados hoy día en las distintas afecciones humanas que conllevan un aumento de la concentración de lípidos en sangre (Olsson y col., 1977). Fue sintetizado por Witte y col. quienes basándose en la molécula de un fármaco utilizado durante mucho tiempo como hipolipidémico, el clofibrato, sintetizaron una serie de compuestos los cuales tenían en común con él el grupo ácido isobutírico. De ellos fue seleccionado el bezafibrato que ha reemplazado al clofibrato en la terapia de las hiperlipemias ya que los estudios comparativos realizados muestran superior actividad del bezafibrato (Stork y Lang, 1975; Olsson y col., 1977; Berndt y col., 1978). Esto permite su utilización a dosis menores con la consecuente disminución de los efectos secundarios.

Otra ventaja del bezafibrato frente al clofibrato es el aumento producido por el primero de los niveles de la fracción lipoproteínica HDL (Rush y Fears, 1982; Schwartzkopff y col., 1982) que de acuerdo con los resultados de estudios epidemiológicos representa un factor de riesgo negativo en cuanto a la morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares, existiendo una correlación inversa entre los niveles de HDL-colesterol y el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria (Miller y Miller, 1975; Rhoads y col., 1977; Gordon y col., 1977).

El bezafibrato además produce una disminución de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina humana normal permitiendo una entrega potencialmente mejorada de oxígeno a los tejidos isquémicos (ej. miocardio) (Perutz y Poyart, 1983).

La estructura química del bezafibrato es:



AC. 2-(4-(2-(4-CLOROBENZAMIDO)ETIL)-FENOXI)-2-METIL-PROPIONICO

Sus efectos sobre los niveles de lípidos en sangre han sido ampliamente estudiados (Stork y Lang, 1975; Olsson y Lang, 1978). Desciende y normaliza los niveles elevados de colesterol y triglicéridos tanto en animales de experimentación (Berndt y col., 1978; Stegmeier y col., 1980; Fahimi y col., 1980) como en el hombre (Wechsler y col., 1980; Arntz y col., 1980), reduce la concentración de las fracciones lipoproteínicas aterogénicas, las VLDL o pre- β -lipoproteínas y las LDL o β -lipoproteínas (Arntz y col., 1980; Bolzano y col., 1980; Olsson, 1980) e incrementa los niveles de la fracción lipoproteínica HDL.

Aunque el mecanismo de acción de este fármaco ha sido objeto de numerosos estudios (Berndt y col., 1978; Lazarow, 1980; Klose y col., 1980; Lazarow y col., 1982), éste no ha sido aún definitivamente establecido pareciendo que intervienen en el mismo varios mecanismos.

En 1976, Lazarow y de Duve observaron que los peroxiso-

mas purificados de hígado de rata eran capaces de oxidar los ácidos grasos de cadena larga (Lazarow y de Duve, 1976), y que este sistema era activado por el tratamiento de las ratas con clofibrato y otros fármacos hipolipidémicos, algunos de los cuales no estaban estructuralmente relacionados (Lazarow y de Duve, 1976; Lazarow, 1977).

Estudios posteriores realizados por estos y otros autores confirmaron este efecto en numerosos fármacos hipolipidémicos entre ellos el bezafibrato (Lazarow, 1980). Por todo esto, el mecanismo de acción más aceptado actualmente para este grupo de fármacos es la activación del sistema de β -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas hepáticos.

El bezafibrato aumenta también de forma significativa la actividad de la lipoproteinlipasa y la triglicerilhidrolasa hepática durante la fase de tratamiento con este fármaco (Klose y col., 1980). Este aumento de la trigliceridilhidrolasa podría indicar que las partículas remanentes, ricas en colesterol, son degradadas, contribuyendo de esta forma, en parte, a la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol. Este continuado efecto del bezafibrato sobre estas enzimas podrían también explicar el aumento de la concentración de las HDL-colesterol.

Por otro lado, el bezafibrato además de poseer una acción hipolipemiente, actúa sobre factores trombogénicos proporcionando una reducción de la agregación plaquetaria (Zimmermann y

col., 1977) y de los elevados niveles de fibrinógeno (Zimmermann y col., 1978), reduciendo en consecuencia la viscosidad sanguínea (Leonhardt y Arntz, 1980).

Resultados obtenidos en este departamento (A. Ayala, 1984a) parecen sugerir que el bezafibrato tiene también un efecto inhibitor sobre la síntesis de ácidos grasos. El tratamiento de ratas con este fármaco impide la inducción de la glucosa-6-P-des-hidrogenasa y 6-P-gluconato-deshidrogenasa del ciclo de las pentosas-fosfato producida por el ayuno-realimentación o por la administración de insulina.

El estudio del efecto del bezafibrato sobre la biosíntesis de lípidos "in vivo", utilizando agua tritiada (A. Ayala, 1984b) demostró que en los principales tejidos lipogénicos de la rata (tejido adiposo e hígado) el bezafibrato impide la inducción de la síntesis de ácidos grasos producida por las dos situaciones lipogénicas antes mencionadas.

Con el fin de ampliar el estudio de las acciones del bezafibrato, nos parece interesante abordar "in vitro" los efectos de este fármaco sobre el metabolismo lipídico. Para ello, utilizaremos células aisladas de los principales tejidos lipogénicos.

1. P A R T E T E O R I C A

=====

1. PARTE TEORICA

1.1. TRANSPORTE DE LIPIDOS EN SANGRE Y ACCION DEL BEZAFIBRATO EN LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares que sirven en el plasma de vehículo de transporte de los lípidos insolubles. Han sido clasificadas en cuatro clases según su densidad (Gofman y col., 1954; Lindgren y col., 1972) y movilidad en electroforesis (Lees y Hatch, 1963; Noble y col., 1969; Papadopoulos y Kintzios, 1969; Hatch y col., 1973): quilomicrones ó lipoproteínas que permanecen en el origen, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o pre- β -lipoproteínas, lipoproteínas de baja densidad (LDL) o β -lipoproteínas y lipoproteínas de

alta densidad (HDL) o α -lipoproteínas.

La tabla I.1 presenta un resumen de las propiedades físico-químicas y las funciones de las lipoproteínas plasmáticas.

El incremento de la concentración de una o más lipoproteínas plasmáticas recibe el nombre de HIPERLIPOPROTEINEMIAS.

La OMS ha propuesto una clasificación internacional de las hiperlipoproteinemias basada en la sugerida por Fredrickson (Fredrickson y col., 1967), y la cual incluye:

1) Hiperlipoproteinemia tipo I o hiperquilomicronemia

Es un desorden raro, el cual parece debido a una deficiencia de lipoproteinlipasa (la enzima necesaria para el aclaramiento de los quilomicrones desde el torrente sanguíneo) o a la ausencia de apoproteína C-II (necesaria para la actividad de la lipoproteinlipasa).

Está caracterizado por aumento de los quilomicrones, acompañado por un marcado incremento en las concentraciones de triglicéridos. A veces existe también un aumento en las concentraciones de las VLDL y colesterol.

2) Hiperlipoproteinemia tipo IIa o hipercolesterolemia

Se manifiesta por un aumento de la concentración de $c\bar{o}$

CLASIFICACION				
Electroforesis	origen	pre- β	β	α
Densidad hidratada	quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
COMPOSICION				
Proteínas(%)	0,5-2,0%	12%	25%	50%
Lípidos(%)	98-99,5%	88%	75%	50%
lípidos mayoritarios	Triglicéridos	Triglicéridos	Colesterol	Colesterol ≈ fosfolípidos
ORIGEN				
	Intestino	Hígado e intestino	Producto metabólico de VLDL	Hígado e intestino
FUNCION				
	Transporte de triglicéridos exógenos	Transporte de triglicéridos endógenos	Transporte de colesterol y fosfolípidos a células periféricas	?Transporte de colesterol des de cél. periféricas al hígado

TABLA I.1. Propiedades físico-químicas y funciones de las lipoproteínas plasmáticas humanas.

lesterol, debido a un incremento selectivo de las concentraciones plasmáticas de las LDL. El defecto principal de esta enfermedad es la falta de síntesis de receptores-LDL.

3) Hiperlipoproteinemia tipo IIb o hiperlipidemia familiar combinada

Se caracteriza por incrementos en las concentraciones de las LDL y VLDL y, por consiguiente, de colesterol y triglicéridos. Es debida a la sobreproducción de apoproteína B y al aumento de la tasa de síntesis y secreción de VLDL por el hígado.

4) Hiperlipoproteinemia tipo III o disbetalipoproteinemia familiar

Caracterizada por la presencia en el plasma de una lipoproteína con movilidad β en electroforesis pero con densidad de VLDL, la cual es probablemente un intermediario en la formación de LDL a partir de VLDL.

Se manifiesta normalmente por hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, y un aumento de la apoproteína E (Kushwaha y Hazzard, 1977) especialmente en las VLDL.

5) Hiperlipoproteinemia tipo IV o hipertrigliceridemia mixta

Es la más frecuente. Es debida a una elevada síntesis de VLDL en el hígado y disminución de su catabolismo. Se caracteriza por un incremento en las concentraciones de las VLDL y los

triglicéridos del plasma.

6) Hiperlipoproteinemia tipo V o hipertrigliceridemia mixta

Caracterizada por un fallo de los sistemas lipolíticos de los quilomicrones y triglicéridos endógenos. Hay aumento en sangre de triglicéridos y quilomicrones, así como de VLDL, con colesteroemia normal.

Los tipos II y IV representan la mayoría de las hiperlipoproteinemias clínicas; los tipos III y IV son infrecuentes, y el tipo I es raro.

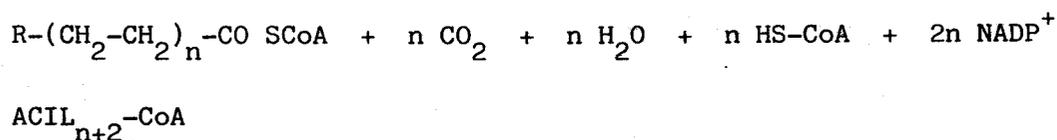
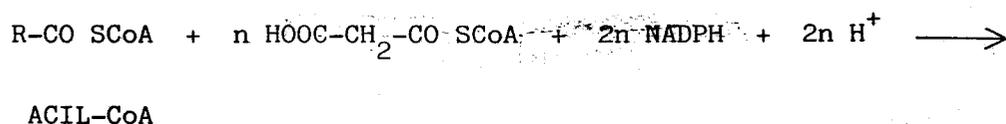
Todos estos tipos de hiperlipoproteinemias pueden ser primarios o secundarios a trastornos clínicos de etiología propia como diabetes mellitus, síndrome nefrótico, alcoholismo, hipotiroidismo, colestasis y otros.

Las hiperlipoproteinemias secundarias tienden a corregirse al tratar la afección primaria, y las hiperlipoproteinemias primarias pueden ser controladas mediante dietas apropiadas y el uso de fármacos. De ellas, el tipo I generalmente responde a tratamiento dietético.

La acción hipolipemiente del bezafibrato ha sido demostrada en múltiples estudios en pacientes con diferentes tipos de hiperlipoproteinemias. Todo ello ha confirmado la acción decisiva

En el segundo paso, dos carbonos derivados del malonil-CoA son añadidos de forma sucesiva a moléculas de acil-CoA, de las que el primer representante es el propio acetil-CoA, el cual actúa como cebador o iniciador. El proceso requiere NADPH como coenzima reductora, y en su conjunto está catalizado por un complejo multi-enzimático denominado ácido graso sintetasa. Este complejo está constituido por 7 enzimas acoplados y utiliza una HS-proteína específica, la proteína portadora de acilos (ACP), como portadora de los acil-derivados intermediarios del proceso.

El bicarbonato que se incorporó en el paso anterior, se libera de nuevo en forma de CO_2 , por lo que todos los átomos de carbono del ácido graso que se forma proceden del acetil-CoA:



La principal fuente de acetil-CoA para la lipogénesis se encuentra en el interior de las mitocondrias, ya que ahí se forma a partir del piruvato derivado de la glucólisis, en la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa, o a partir de algunos aminoácidos. La membrana mitocondrial es impermeable al acetil-CoA, siendo la principal vía de salida de este acetil-CoA para su utili

zación como sustrato en la lipogénesis en forma de citrato, sintetizado en la primera reacción del ciclo del ácido cítrico mediante su condensación con oxalacetato por acción de la citrato sintetasa.

1.2.1.2. Regulación

Como se ha descrito anteriormente, la síntesis de novo de ácidos grasos está catalizada por dos sistemas enzimáticos citoplasmáticos, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa. La acetil-CoA carboxilasa, que cataliza el paso de acetil-CoA a malonil-CoA, es el primer paso específico de la síntesis de ácidos grasos, puesto que el malonil-CoA no tiene otra alternativa metabólica, y es la principal candidata a regular todo el proceso.

De hecho, el contenido de acetil-CoA carboxilasa cambia con la velocidad de síntesis de ácidos grasos en una gran variedad de condiciones metabólicas (Tepperman y Tepperman, 1958; Fitch y Chaikoff, 1960; Silpananta y Goodridge, 1971) y hormonales (Spence y Pitot, 1982). La diabetes mellitus produce una bajada de los niveles enzimáticos (Wieland y col., 1963; Kornacker y Lowestein, 1964; Shrago y Lardy, 1966), mientras que está elevada en la obesidad genética (Nakanishi y Numa, 1971). Además, su actividad catalítica está afectada por un gran número de metabolitos como efectores positivos y negativos: ácidos tri- y dicarboxílicos, fundamentalmente citrato y isocitrato (Matsuhashi y col., 1964; Moss y

col., 1972) la activan; por el contrario, acil-CoA de cadena larga (Goodridge, 1972), malonil-CoA (Matsushashi y col., 1964; Hashimoto y Numa, 1971) y algunos metabolitos del triptófano, tales como kinurenato y xantunerato (Hashimoto y col., 1971) son inhibidores.

El citrato es un precursor de acetil-CoA, que es el sustrato de esta enzima, por tanto, el papel regulador del citrato es una activación de una vía posterior por un metabolito producido anteriormente (activación "feedforward"). Por otro lado, la inhibición por acil-CoA de cadena larga es un mecanismo de retroinhibición por producto final.

La acetil-CoA carboxilasa es una enzima que contiene biotina como grupo prostético. Puede encontrarse en forma fosforilada o desfosforilada, estando este proceso controlado hormonalmente. La actividad enzimática inicial está regulada por el grado de fosforilación en dos sitios (o grupos de sitios): la insulina y la adrenalina aumentan el grado de fosforilación de la enzima en dos sitios separados con efectos opuestos, es decir, activación por insulina e inhibición por adrenalina (Brownsey, 1981; Denton y col., 1981). El glucagón, al igual que la adrenalina produce inhibición de la enzima (Geelen y col., 1978; Witters y col., 1979; Zammit y Corstorphine, 1982).

El complejo de la ácido graso sintetasa, al igual que la acetil-CoA carboxilasa, se considera también un sistema enzimático

regulador de la síntesis de ácidos grasos, ya que puede ser activado tres a cinco veces por varios azúcares fosforilados, siendo la fructosa-1,6-difosfato el más efectivo. Dicho metabolito revierte la inhibición por exceso de su sustrato malonil-CoA, que compete con NADPH (Plate y col., 1968). La ácido graso sintetasa de hígado de rata se inhibe también por acil-CoA de cadena larga (Tubbs y Garland, 1964).

1.2.2. Regulación de la β -oxidación de ácidos grasos

1.2.2.1. β -oxidación en mitocondrias

La principal vía en el catabolismo de los ácidos grasos se denomina β -oxidación, y en ella se van liberando secuencialmente unidades de dos átomos de carbono en forma activa (acetil-CoA), comenzando por el terminal carboxílico.

Para entrar en la β -oxidación mitocondrial, los ácidos grasos han de activarse a acil-CoA por acción de la acil-CoA sintetasa o tioquinasa. Los ácidos grasos de cadena corta son activados por acil-CoA sintetasas dentro de la matriz mitocondrial (Aas y Bremer, 1968) mientras que la formación de acil-CoA de cadena larga ocurre en el retículo endoplásmico o en la cara interna de la membrana externa de la mitocondria (Aas y Bremer, 1968; Van Tol y Hulsmann, 1970).

Los siguientes pasos de la β -oxidación tienen lugar en el

interior de las mitocondrias y al ser la membrana mitocondrial impermeable a los acil-CoA de cadena larga, éstos requieren un sistema de transporte a través de dicha membrana siendo la carnitina la molécula que actúa como transportador. Así, por acción de la acil-carnitina transferasa I, localizada en la cara externa de la membrana interna de la mitocondria, los acil-CoA reaccionan con la carnitina para formar acil-carnitina y coenzima A. Los derivados acil-carnitina penetran la membrana mitocondrial y, en su cara interna, vuelven a convertirse en acil-CoA por acción de la acil-carnitina transferasa II (Kopec y Fritz, 1973).

Los acil-CoA dentro de las mitocondrias entran ya en la β -oxidación, la cual comprende cuatro reacciones (deshidrogenación, hidratación, deshidrogenación y rotura tiolítica) sufriendo la acción sucesiva de cuatro enzimas localizadas en la matriz mitocondrial: acil-CoA deshidrogenasa, enoil hidratasa o crotonasa, β -hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa y tiolasa. La primera de estas enzimas, la acil-CoA deshidrogenasa, es una flavoproteína que contiene FAD como grupo prostético. Beinert, en su revisión de las acil-CoA deshidrogenasas de mitocondria afirma que la mayoría de los tejidos estudiados tienen dos (y el hígado de cerdo tres) acil-CoA deshidrogenasas activas sobre acil-CoA de cadena corta, (media) y larga (Beinert, 1963). Las otras tres enzimas de la β -oxidación parecen ser activas sobre todos los sustratos de diferente longitud de cadena (Stern, 1961; Wartmann y Lünen, 1961; Wakil, 1963).

Como producto de la acción de estas cuatro enzimas se for

ma acetil-CoA y un acil-CoA con dos átomos de carbono menos que el sustrato inicial, que vuelve a entrar en la secuencia oxidativa. El acetil-CoA generado puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico para su oxidación a CO_2 o puede ser convertido en acetoacetato.

1.2.2.2. β -oxidación en peroxisomas

La β -oxidación de ácidos grasos hasta la formación de acetil-CoA no sólo tiene lugar en la mitocondria, sino también en los peroxisomas.

Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos que se caracterizan por poseer catalasa y oxidasas productoras de H_2O_2 (de Duve y Baudhin, 1966).

En 1976, Lazarow y de Duve descubrieron un sistema para la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga en peroxisomas de hígado de rata (Lazarow y de Duve, 1976) que ha sido también detectado en hígado humano (Bronfman y col., 1979).

Al igual que la β -oxidación mitocondrial, este sistema se inicia a partir de la forma activa de los ácidos grasos, el acil-CoA. La entrada de los ácidos grasos de cadena larga a los peroxisomas no precisa de carnitina, y en el interior de estos orgánulos se forma directamente acil-CoA en una reacción catalizada por la tioquinasa a partir de los ácidos grasos que proceden del citosol.

Las reacciones que participan en la β -oxidación peroxisomal (Figura 1.1, Lazarow y de Duve, 1976) se inician por la transferencia de los electrones del acil-CoA al oxígeno molecular, con la formación de enoilacil-CoA y H_2O_2 . Las reacciones subsiguientes son iguales a las que tienen lugar en mitocondrias: adición de agua al doble enlace, oxidación del grupo hidroxilo a cetónico con reducción del NAD^+ , y adición de coenzima A para la tiolisis de acetil-CoA y formación de un acil-CoA con dos átomos menos de carbono que vuelve a iniciar el ciclo.

Este sistema de β -oxidación peroxisomal es igual al descrito por Cooper y Beevers para los glioxisomas de endospermo de semillas de judías (Cooper y Beevers, 1969).

Las enzimas que catalizan las reacciones peroxisomales han sido purificadas y parcialmente caracterizadas a partir de hígado de rata, siendo todas distintas de las enzimas mitocondriales correspondientes. La primera es una flavoproteína oxidasa que posee FAD como grupo protético y es activa sólo para ácidos grasos de cadena larga.

El sistema de β -oxidación peroxisomal oxida acil-CoA saturados con una longitud de cadena de 7 a 22 ó más átomos de carbono (Lazarow, 1978a; Osumi y Hashimoto, 1978). También oxida activamente acil-CoA insaturados de cadena larga (Osmunden y col., 1979).

El destino de los acetil-CoA y los acil-CoA de cadena cor

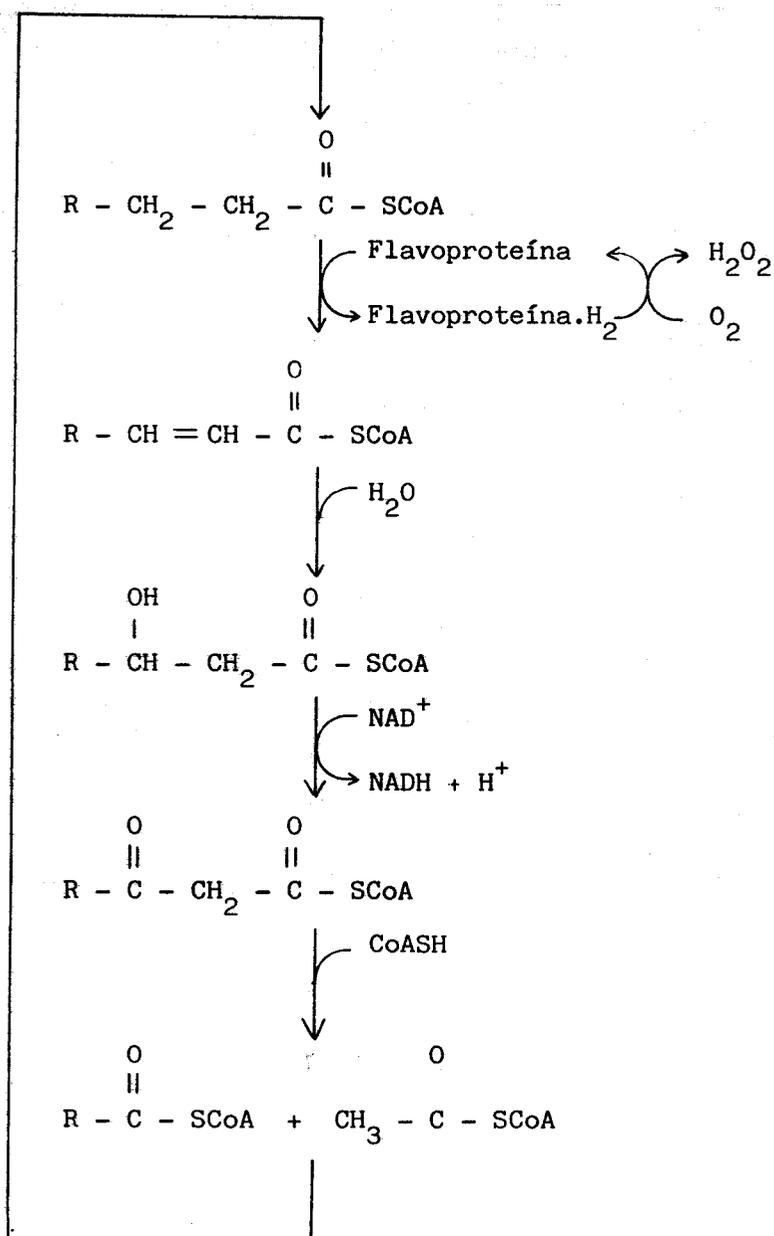


FIGURA 1.1. Sistema de β -oxidación peroxisomal (Lazarow y de Duve, 1976)

ta formados y para los que este sistema de oxidación peroxisomal es inactivo no está claro. Podrían ser transportados a la mitocondria para continuar allí la oxidación. En este transporte participarían las enzimas acetil-carnitina transferasa y acil-carnitina transferasa de cadena media presentes en los peroxisomas (Markwell y col., 1973). El acetil-CoA podría también ser utilizado en reacciones biosintéticas en algun otro lugar de la célula, lo cual es apoyado por el hecho de que este es el destino en el protozoo Tetrahymena pyriformis y en el endospermo de semillas de judías, los cuales también poseen sistema de β -oxidación peroxisomal.

Esta secuencia de β -oxidación peroxisomal, a diferencia de la mitocondrial, no está acoplada a un sistema de fosforilación y no es inhibida por cianuro (Lazarow y de Duve, 1976).

Así pues, el metabolismo de los ácidos grasos depende, en un grado considerable, de la longitud de la cadena como lo demuestran los estudios enzimológicos de fraccionamiento celular y metabólicos (Deuel, 1957; Fritz, 1961; Aas y Bremer, 1968; Van Tol y Hulsmann, 1970; Aas, 1971; Lazarow, 1978a).

La única vía catabólica para los ácidos grasos de cadena corta sería la β -oxidación mitocondrial independiente de carnitina.

Los ácidos grasos de cadena larga tienen tres posibles destinos en el hígado no disponibles para los ácidos grasos de ca-

dena corta:

- 1) oxidación mitocondrial dependiente de carnitina (Fritz, 1961).
- 2) catabolismo peroxisomal (Lazarow, 1980).
- 3) esterificación para formar triglicéridos y fosfolípidos (Deuel, 1957; Mayes y Felts, 1967; McGarry y Foster, 1971).

1.2.2.3. Regulación

El flujo a través de la β -oxidación, la cual teóricamente podría ser regulada por cambios en la actividad de cualquiera de los enzimas que comprende el complejo, está probablemente determinado por la disponibilidad de sustratos para la β -oxidación (Bremer y Wojtczak, 1972), los ácidos grasos libres. Como se ha descrito anteriormente, un factor importante que controla la entrada de ácidos grasos en la mitocondria es la acil-carnitina transferasa I, cuya actividad es inhibida por el malonil-CoA (McGarry y col., 1977; McGarry y col., 1978a; McGarry y col., 1978b). Este metabolito es intermedio de la lipogénesis, y precisamente su aumento en la célula ocurre cuando esta vía está activada. Por este mecanismo, al inhibir a la acil-carnitina transferasa I, hace que cuando la actividad de lipogénesis es alta, la entrada de ácidos grasos (y, por tanto, su oxidación) a la mitocondria sea baja, y viceversa. Este control inverso de lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos a nivel de disponibilidad de éstos para su entrada a la mitocondria (o para

su esterificación en el citoplasma), conviene contemplarlo en relación a los propios mecanismos de regulación de la lipogénesis. Así, un aumento en la utilización de carbohidratos (por la alimentación o por un aumento de los niveles de insulina plasmática), favorece tanto la síntesis de ácidos grasos como la de glicerol-3-fosfato, activando la esterificación e inhibiendo el sistema de transferencia de grupos acilos a la mitocondria. Por el contrario, una disminución de la disponibilidad de carbohidratos (en el ayuno o en la diabetes), inhibe la lipogénesis y la esterificación de ácidos grasos, favoreciendo su entrada a la mitocondria (Figura 1.2).

También existe un control intramitocondrial de la β -oxidación. Tanto la degradación de ácidos grasos a acetil-CoA como su subsiguiente oxidación a CO_2 y H_2O por el ciclo del ácido cítrico requieren de ADP para su acoplamiento con la fosforilación oxidativa. Si la relación ATP/ADP en mitocondrias es alta, no funciona la cadena respiratoria y se inhibe la oxidación de ácidos grasos por imposibilidad de transferir a aquella los electrones producidos en ésta.

La β -oxidación mitocondrial estará también regulada por la velocidad de regeneración de aceptores de H por la cadena respiratoria y la provisión de CoA.

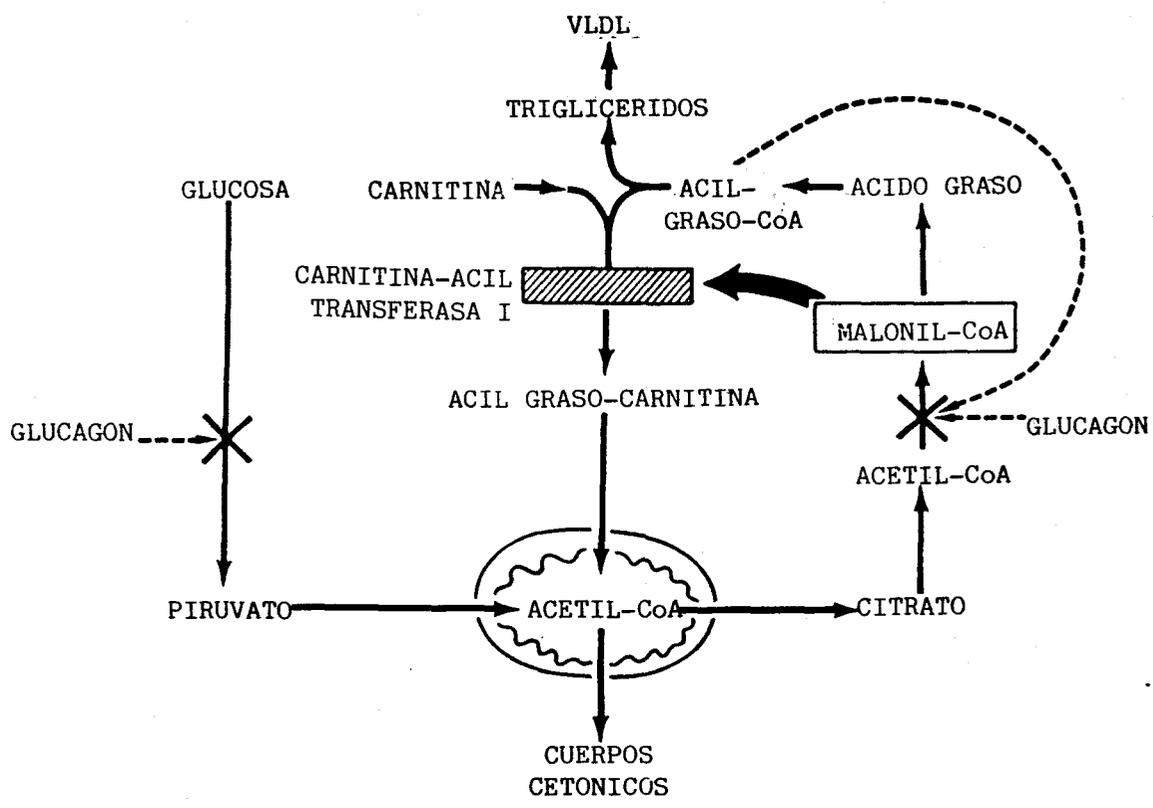


FIGURA 1.2. Interacciones de la regulación entre las vías de síntesis y oxidación de ácidos grasos en el hígado.

2. P L A N D E T R A B A J O

2. PLAN DE TRABAJO

1) Estudio del efecto inhibitor del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos.

Este efecto se estudiará en células aisladas de distintos tejidos lipogénicos: hígado, tejido adiposo y glándula mamaria.

Los adipocitos y hepatocitos serán aislados de ratas ayunadas 48 horas y realimentadas con una dieta glucídica durante otras 48 horas, condición nutricional que produce una fuerte activación de la lipogénesis (Young y col., 1964; Timmers y Knittle, 1980). Los acini de glándula mamaria se aislarán de madres lactantes 15-18 días después del parto y alimentadas ad libitum con dieta normal.

En estas células se estudiará el efecto producido por el bezafibrato sobre la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos y la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucosa- $U-^{14}\text{C}$:

a) efecto "in vitro" mediante la utilización de dichas células incubadas en presencia de distintas concentraciones de bezafibrato.

b) efecto "in vivo" mediante la utilización de dichas células procedentes de ratas tratadas con 400 mg/kg/día de bezafibrato los dos días previos a la realización del experimento. Así pues, sería el estudio "in vitro" del efecto del bezafibrato "in vivo".

2) Estudio de la inducción de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal producida por el bezafibrato

Se estudiará el $^{14}\text{CO}_2$ y los productos solubles en ácido producidos al incubar hepatocitos aislados de ratas ayunadas-realimentadas en presencia de ácido (1- ^{14}C)-caprílico y ácido (1- ^{14}C)-palmítico. Al igual que los estudios de la lipogénesis, se realizará:

a) estudio del efecto "in vitro" al adicionar distintas concentraciones de bezafibrato a las células aisladas.

b) estudio del efecto "in vivo", que se realizará en células aisladas de ratas tratadas con 400 mg/kg/día de bezafibrato los dos días previos al experimento.

3. M A T E R I A L Y M E T O D O S

=====

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Animales de experimentación

Se han utilizado ratas hembras de la raza Wistar, de peso aproximado entre 150-250 gramos.

3.1.2. Medios instrumentales

Las pesadas se realizaron en una balanza Mettler H31AR y en un granatario Sartorius 3719 MP.

Para la determinación del pH se utilizó un medidor de

pH Radiometer Copenhagen pHM80.

Las centrifugaciones a temperatura ambiente se llevaron a cabo en una centrífuga de mesa Selecta, modelo Centronic, y las centrifugaciones en frío se realizaron en una centrífuga Kontron Centrikon H-401.

En la obtención e incubación de las células se utilizó un baño Selecta, modelo Unitronic-320. Para la incubación de los adipocitos se usó un agitador termostatzado con movimiento circular Gallenkamp. Para la obtención de los hepatocitos se utilizó una bomba peristáltica Heidolph.

Las determinaciones radiométricas se realizaron en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1.800 (Beckman Instruments, California, U.S.A.).

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Heidolph. Para disolver el bezafibrato se utilizó un generador de ultrasonidos Ultrasons (Selecta, España).

3.1.3. Productos

La dieta estándar administrada a los animales fue suministrada por Panlab (España). La dieta especial rica en hidratos de carbono (utilizada para la obtención de los animales ayunados-

realimentados) procedía de Altromin (Alemania).

Para la preparación de tampones y demás soluciones se emplearon reactivos de Sigma Chemical (U.S.A.) y Merck (Darmstadt, - Alemania).

El tolueno, alcohol isopropílico, hexano, tritón X 100, - éter etílico y éter de petróleo fueron suministrados por Panreac - (España) y Merck (Darmstadt, Alemania).

El 2,5 difeniloxazol (PPO) utilizado en el líquido de centello, el carbón activo usado para la separación de ácidos grasos de la albúmina sérica, y los sustratos ácido caprílico y ácido palmítico, sales sódicas, procedían de Sigma Chemical Co. (U.S.A.)

La albúmina sérica bovina, fracción V, era de Armour - Pharmaceutical Company (U.S.A.).

La colagenasa utilizada para la obtención de las células fue suministrada por Boëhringer (Mannheim, Alemania).

La feniletilamina procedía de Scharlan (España).

Los sustratos marcados (1-¹⁴C)-ácido octanoico y (1-¹⁴C) ácido palmítico, fueron suministrados por New England Nuclear - (U.S.A.). Y la (U-¹⁴C)-glucosa por Radiochemical Centre (Amershan, Inglaterra).

El bezafibrato utilizado fue el comercializado (Difate - rol, marca registrada) por laboratorios Andreu, Barcelona.

Así mismo, se utilizó bezafibrato puro, suministrado por Boëhringer (Barcelona).

3.2. METODOS

3.2.1. Situación nutricional de las ratas

Las ratas utilizadas para la obtención de adipocitos y hepatocitos fueron sometidas a ayuno-realimentación. Para ello, fueron privadas de alimento durante 48 horas, al término de las cuales se les colocó una dieta especial rica en hidratos de carbono de la que se alimentaron durante 48 horas. Durante los cuatro días tuvieron libre acceso al agua.

Las ratas usadas para la obtención de acini de glándulas mamarias tuvieron libre acceso a comida (dieta estándar de laboratorio) y agua.

3.2.2. Control del período de lactancia

Para la obtención de acini de glándulas mamarias se utilizaron ratas con un período de lactancia de 15-18 días, fecha que

se considera como de máxima capacidad lactogénica.

3.2.3. Tratamiento de las ratas

A las ratas tratadas con bezafibrato se les administró - los dos días previos a la realización del experimento 400 mg/Kg/día de bezafibrato mediante intubación gástrica.

3.2.4. Obtención de albúmina libre de ácidos grasos

Para separar los ácidos grasos de la albúmina sérica se utilizó la técnica descrita por Chen (1967). Para ello se disolvió 7,0 g de albúmina en 70 ml de agua destilada a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió 3,5 g de carbón activado (previamente lavado, filtrado y secado) y se ajustó el pH a 3,0 con ClH.

La solución se colocó en un baño de hielo y se mezcló durante una hora. Se filtró y se dializó frente a solución salina de alta concentración (si era para incubación de hepatocitos), frente a tampón fosfato (para adipocitos) o frente a solución de Krebs-Henseleit (para acini).

La solución final se ajustó a pH 7,0 mediante la adición de NaOH.

3.2.5. Obtención de adipocitos

Los adipocitos se aislaron según la técnica descrita por

Rodbell (1967).

Las ratas se sacrifican por dislocación cervical, extra-
yéndoles rápidamente el tejido adiposo. Después de pesado, se colo-
ca en un vial de plástico y se trocea. Al vial se le añade 1 mg de
colagenasa y 1 ml de albúmina 3% en tampón fosfato por cada gramo
de tejido, y se incuba durante una hora en un baño a 37°C y con a-
gitación lateral.

La composición del tampón fosfato es: NaCl (120 mM), KCl
(4,75 mM), CaCl₂ (1,2 mM), MgSO₄ (1,2 mM) y Na₂HPO₄ (10 mM). Se le
añade albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos para una con-
centración 3% y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH.

Terminada la incubación, se filtra a través de una malla
y el filtrado se centrifuga a 70 x g durante 20 segundos. El líqui-
do se desecha y las células se resuspenden en tampón-albúmina 3%.
Se lavan los adipocitos dos veces en este medio, se determina su
peso húmedo, y se resuspenden en el mismo tampón en la proporción
de 4,5 ml por cada gramo de células.

Para el conteo celular se diluyen 20 µl de suspensión de
células en 1 ml de tampón-albúmina 3%, y de esta suspensión se co-
locan 5 µl en un portaobjetos contando al microscopio el número de
células.

Para la determinación del peso seco evaporamos en estufa

1 ml de suspensión de células y 1 ml de tampón-albúmina 3%, obteniéndose el peso seco por diferencia entre estos dos valores.

3.2.6. Incubación de adipocitos

Los adipocitos se incubaron en tubos de plástico que estaban a su vez introducidos en tubos de vidrio con un brazo lateral para la recogida de CO_2 .

Para la incubación se utilizó 0,3 ml de suspensión de células y 0,7 ml de tampón-albúmina 3% más los diferentes sustratos (volumen final: 1 ml). La concentración de glucosa en el medio fue de 2 mM y la cantidad de glucosa radiactiva era 0,125 μCi .

Los tubos se gasearon con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) durante 15 segundos, se cerraron con tapones de goma, y se incubaron a 37°C con agitación circular a 140 rpm.

3.2.7. Obtención de hepatocitos

Los hepatocitos han sido aislados según la técnica descrita por Berry y Friend (1969), con las modificaciones introducidas por Cornell y col. (1973).

El animal se anestesia con una inyección intraperitoneal de tiopental Na (60 mg/ml P/V) disuelto en NaCl 0,9%, en una dosis de aproximadamente 0,1 ml/100 g de peso corporal. Se le administra

heparina (100 U.I./rata) vía intravenosa (safena).

Se canulan las venas cava superior y porta, haciéndose pasar inmediatamente el líquido de la perfusión (150 ml) que se compone de solución salina de Krebs-Henseleit (1932) libre de calcio y contiene: NaCl (149,1 mM), KCl (5,5 mM), KH_2PO_4 (1,4 mM), MgSO_4 (2,9 mM), glucosa (15 mM) y NaHCO_3 (22,8 mM).

Los 50 ml primeros de la perfusión se usan para limpiar el hígado de sangre y se desechan. Una vez limpio el hígado, se disuelve en el medio de perfusión colagenasa (30 mg/100ml) y se continúa la perfusión en circuito cerrado durante 20 minutos (figura 3.1). Terminado este proceso, se extrae el hígado que es troceado finamente en un vaso de precipitado. Se añade el medio de perfusión y se incuba durante 5 minutos en un baño a 37°C con agitación lateral y en atmósfera de carbógeno. Terminada la incubación se filtra a través de una malla y el filtrado se centrifuga a 60 x g durante 5 minutos.

El sobrenadante se desecha y el precipitado se resuspende en solución salina Krebs-Henseleit (1932) que contiene albúmina libre de ácidos grasos al 2,5%.

La composición del medio de Krebs-Henseleit (pH=7,4) es la siguiente: NaCl (137,8 mM), KCl (5,4 mM), KH_2PO_4 (1,4 mM), MgSO_4 (2,9 mM), NaHCO_3 (4,3 mM) y CaCl_2 (3 mM).

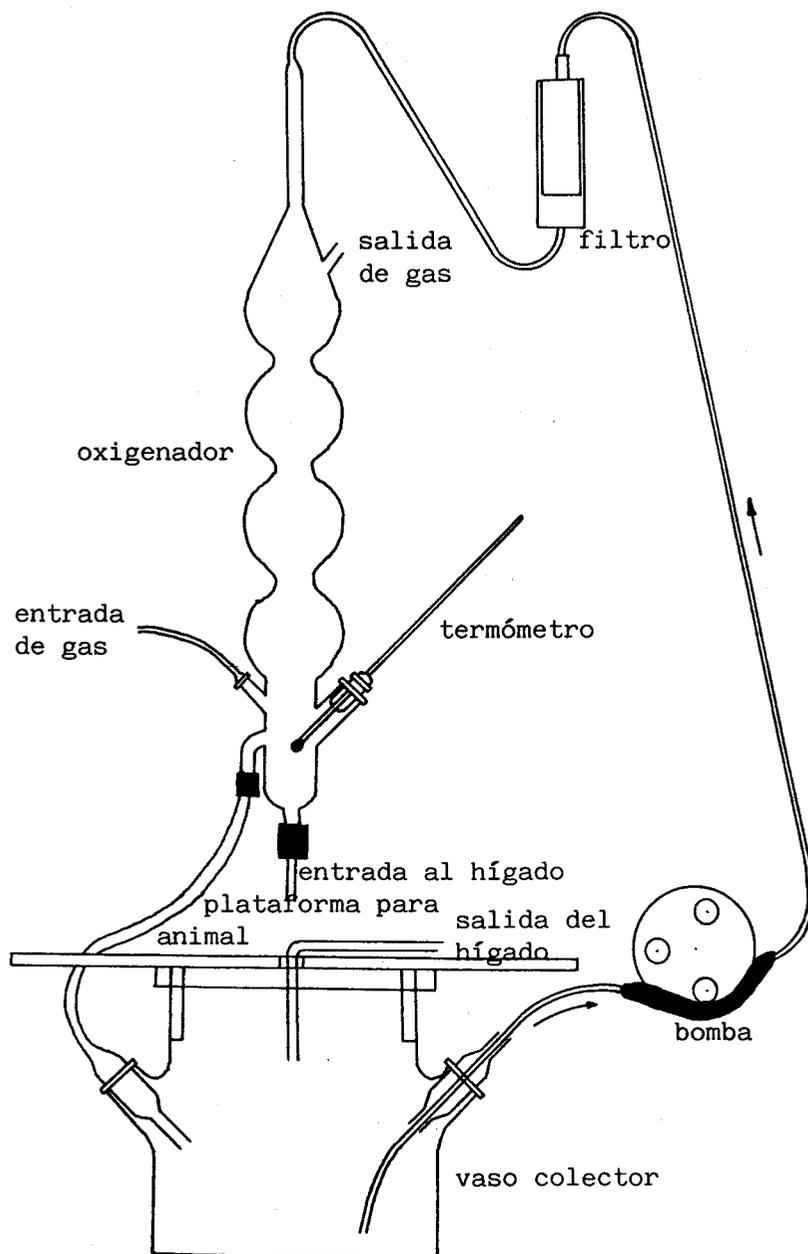


FIGURA 3.1. Aparato de perfusión utilizado en la obtención de hepatocitos.

La composición de la solución salina de alta concentración es igual que la anterior excepto la concentración de NaHCO_3 que es de 25,6 mM.

Los hepatocitos se lavan dos veces en el medio de Krebs-Henseleit con albúmina y se determina su peso húmedo. Se resuspenden en la proporción de 4,5 ml por gramo de células que se filtran a través de una malla de menor luz que la anterior procedente de un equipo con filtro V-2400 de Baxter (Baxter Ibérica, S.A.).

Para determinar la viabilidad celular, las células se diluyen diez veces en eritrosina 0,01% (P/V) disuelta en NaCl 0,9% (P/V). Esta suspensión se lleva a una cámara de recuento donde se realiza el contaje celular. Las células teñidas con el colorante se consideran no viables. El porcentaje de células no viables sobre el total oscilaba entre el 8-12% a los 15-30 minutos después de obtenidos los hepatocitos.

3.2.8. Incubación de hepatocitos

Los hepatocitos se incubaron en matraces erlenmeyer de 25 ml.

Para los estudios de incorporación de glucosa marcada a CO_2 , triglicéridos y ácidos grasos se incubaron 0,6 ml de suspensión celular con 1,4 ml de medio Krebs-Henseleit-albúmina más los sustratos (volumen final: 2 ml). La concentración de glucosa era de 15 mM y la cantidad de glucosa radiactiva fue de 1 μCi .

Para los experimentos de β -oxidación se utilizó 1 ml de suspensión de células y 1,5 ml de medio de Krebs-Henseleit-albúmina más los distintos sustratos (volumen final: 2,5 ml). La concentración de ácido graso (palmítico o caprílico) en el medio fue de 0,4 mM y la cantidad de radiactividad ($1-^{14}\text{C}$ -palmítico ó $1-^{14}\text{C}$ -caprílico) era de 1 μCi .

Los matraces se gasearon con carbógeno durante 20 segundos y se cerraron con tapones de goma.

Las incubaciones se realizaron a 37°C en un baño termostático con agitación lateral de 95-100 oscilaciones/minuto.

3.2.9. Obtención de acini de glándula mamaria

Los acini de glándula mamaria han sido aislados siguiendo básicamente el método descrito por Katz y col. (1974) modificado por Robinson y Williamson (1977).

Tras sacrificar la rata por dislocación cervical se le extrae entre 6 y 7 g de glándula mamaria que se trocea finamente con ayuda de una cuchilla de afeitar y unas tijeras. El tejido cortado se lava 3 ó 4 veces con tampón Krebs-Henseleit (el mismo utilizado para la obtención de hepatocitos) que se prepara extemporáneamente y se gasea con carbógeno hasta alcanzar un pH de 7,4. El tejido lavado se transfiere a un erlenmeyer con 35 ml de medio de digestión que contiene medio de Krebs-Henseleit, colagenasa (1 mg/

ml) y glucosa 10 mM. La digestión se lleva a cabo en un baño termostático a 37°C, agitación vigorosa y gaseo constante con carbógeno durante 60 minutos. El tejido digerido se filtra a través de una malla de nylon de 450 μm y el filtrado se centrifuga a 20 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. El precipitado resultante, donde están contenidos los acini, se lava dos veces con el tampón Krebs-Henseleit y sucesivas centrifugaciones. A continuación, los acini obtenidos se resuspenden en el mencionado tampón (10 ml por cada gramo) y se transfieren a un vaso donde se agitan durante 5 minutos y desde allí se dispensan a los erlenmeyer de incubación.

Todo el material de vidrio utilizado es siliconado previamente.

3.2.10. Incubación de los acini

Las incubaciones se realizaron en matraces erlenmeyer siliconados de 25 ml.

Para la incubación se utilizaron 0,5 ml de suspensión de células y 1,5 ml de medio de Krebs-Henseleit, albúmina bovina libre de ácidos grasos 3% y los diferentes sustratos (volumen final: 2 ml). La concentración de glucosa en el medio era de 5 mM y la cantidad de glucosa radiactiva fue de 0,250 μCi .

Los matraces se gasearon con carbógeno durante 20 segun-

dos y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación constante de 95-100 oscilaciones/minuto.

3.2.11. Determinación de $^{14}\text{CO}_2$

Para la determinación del $^{14}\text{CO}_2$ generado a partir de glucosa marcada por adipocitos, las células se incubaron en tubos de plástico introducidos en tubos de vidrio con un brazo lateral donde se colocó papel de filtro. Se gasearon con carbógeno durante 15 segundos y se cerraron con tapones de goma perforables.

Cuando se determinó el $^{14}\text{CO}_2$ generado a partir de sustratos marcados (glucosa, ácido caprílico o ácido palmítico) por hepatocitos, o a partir de glucosa por acini, se usaron matraces erlenmeyer de 25 ml provistos de un pocillo central donde se colocó un tubito de plástico que contenía papel de filtro. En el compartimento externo se añadió la suspensión de células (hepatocitos o acini), el medio de incubación y los sustratos. Se gasearon durante 20 segundos y se cerraron con tapones de goma perforables.

En todos los casos se utilizaron 4 trozos de papel de filtro con una superficie de 15x25 mm cada uno.

Finalizado el tiempo de incubación (1 hora para los experimentos de incorporación de glucosa y 20 minutos para los estudios de β -oxidación), se colocaron los tubos o matraces en hielo (para la β -oxidación también se añadió al compartimento externo del erlenmeyer 0,4 ml ClO_4H 70% P/V), añadiéndose al papel de filtro 0,2 ml

de feniletilamina.

Se dejaron reposar durante 30-60 minutos y, transcurrido este período, se tomó el papel de filtro y se colocó en un vial de centelleo determinándose la radiactividad por centelleo líquido.

Se ha medido $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de glucosa-U- ^{14}C , ácido (1- ^{14}C)-caprílico y ácido (1- ^{14}C)-palmítico.

Se pudo comprobar que la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ácido caprílico y ácido palmítico marcados era lineal en el tiempo empleado (Figuras 3.2 a y b). Asimismo, comprobamos la linealidad en el tiempo empleado de la formación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucosa marcada en todas las condiciones utilizadas.

El líquido de centelleo utilizado en todas las determinaciones estaba compuesto por: tolueno 2p, tritón X 100 1p y PPO 5 g/l.

3.2.12. Incorporación de glucosa marcada en triglicéridos y ácidos grasos

La incorporación de glucosa-U- ^{14}C en triglicéridos y ácidos grasos se ha determinado según el método de Rodbell (1964).

Terminado el tiempo de incubación (60 minutos), los triglicéridos son extraídos mezclando 2 ml del medio de incubación con

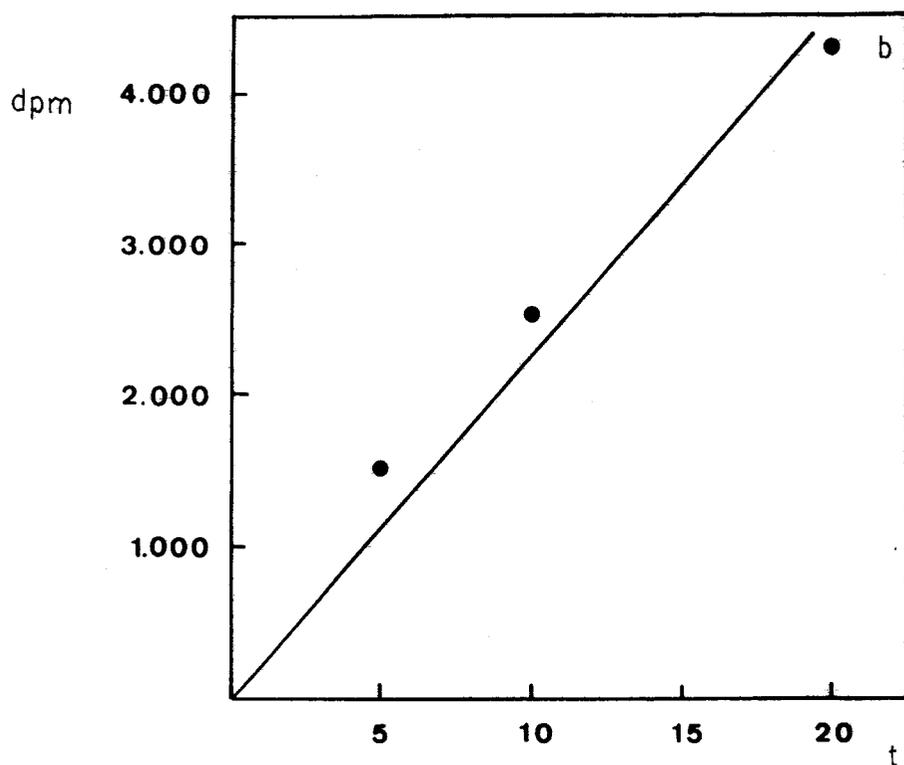
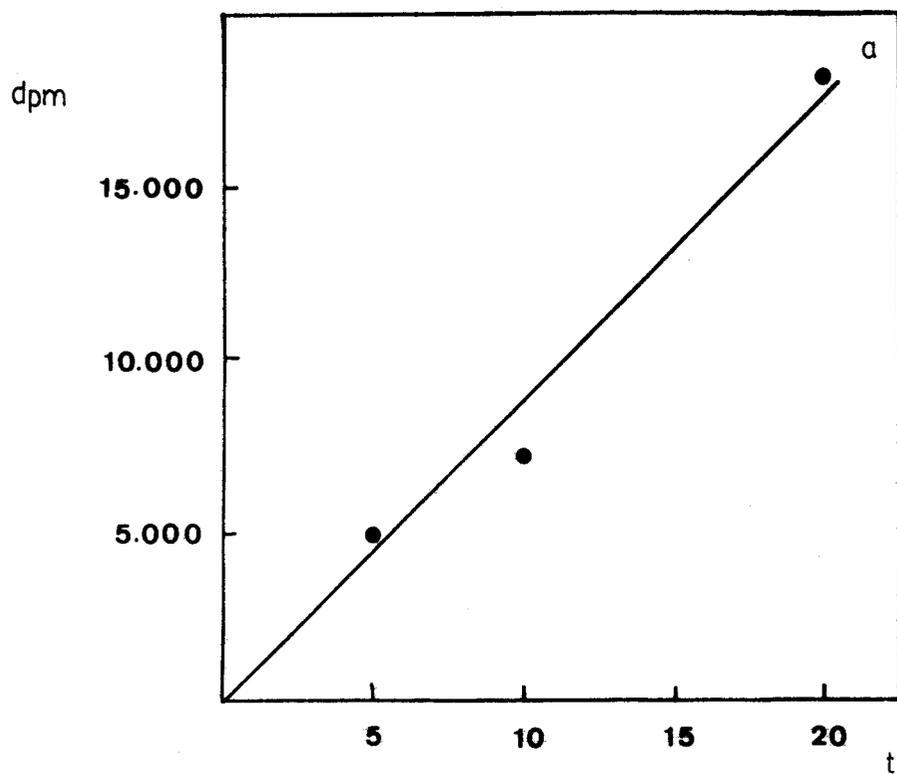


FIGURA 3.2. $^{14}\text{CO}_2$ procedente de ácido (1- ^{14}C)-caprílico (a) y ácido (1- ^{14}C)-palmítico (b) frente a tiempo de incubación de hepatocitos. La concentración de ácido graso en el medio era de 0,4 mM.

5 ml de mezcla Dole (200 ml de hexano, 800 ml de alcohol isopropílico y 20 ml de H_2SO_4 1N), 3 ml de hexano y 1,5 ml de agua destilada. Los tubos se agitan durante 30 segundos y en 1 ml de fase orgánica se cuantifican las dpm incorporadas en triglicéridos.

Para medir las dpm incorporadas en ácidos grasos es necesario la hidrólisis alcalina de los triglicéridos. Para ello se toman 2 ml de fase orgánica de la extracción anterior y se evaporan a sequedad por calentamiento a $70^\circ C$, se le añaden 0,5 ml de KOH 2,8% (P/V en etanol 96°) y se mantienen a $70^\circ C$ durante 30 minutos. Transcurrido este período se extraen los ácidos grasos con 2,5 ml de hexano, 2 ml de mezcla Dole y 1 ml de H_2SO_4 1N. Se agitan los tubos durante 30 segundos y se dejan reposar. Dos ml de la fase orgánica se usan para cuantificar las dpm incorporadas a ácidos grasos.

Hemos comprobado que en todas las condiciones descritas la producción de triglicéridos y ácidos grasos a partir de glucosa marcada es lineal en el tiempo empleado.

3.2.13. Estudio de la β -oxidación de ácidos grasos

Para la estimación de la β -oxidación de ácidos grasos se determinó la incorporación en $^{14}CO_2$ y en productos solubles en ácido de dos ácidos grasos marcados: uno de cadena larga (ác. (1- ^{14}C)-palmítico) y otro de cadena corta (ác. (1- ^{14}C)-caprílico).

Para las incubaciones de los hepatocitos, que se realizaron según la técnica descrita por McGarry y col. (1978), se utilizan matraces erlenmeyer de 25 ml los cuales contenían 1 ml de suspensión de células y 1,5 ml de medio Krebs-Henseleit-albúmina más los diferentes sustratos (volumen final: 2,5 ml).

Los matraces se gasean con carbógeno durante 20 segundos, se cierran con tapones de goma y se incuban a 37°C en baño con agitación lateral durante 20 minutos. Este tiempo de incubación se eligió ya que aunque la producción de $^{14}\text{CO}_2$ era lineal hasta los 60 minutos (Figuras 3.2 a y b), la formación de productos solubles en ácido aumenta hasta los 20 minutos y a partir de aquí permanece invariable (Figuras 3.3 a y b).

Al terminar la incubación se añade a los matraces 0,4 ml de HClO_4 70% P/V y se colocan en hielo.

El $^{14}\text{CO}_2$ generado se determinó según la técnica descrita en el apartado 2.11. Para determinar la incorporación de ^{14}C en productos solubles en ácido se siguió la técnica descrita por Mannaerts y col. (1979). Para ello, los extractos perclóricos se llevan a pH 4 con Tampón acetato 3M y se extraen dos veces con éter de petróleo (si el sustrato es ácido palmítico) o con éter dietílico (si el sustrato es ácido caprílico) para eliminar las trazas de ácidos grasos marcados.

De la fase acuosa se toman 200 μl que se colocan en vial

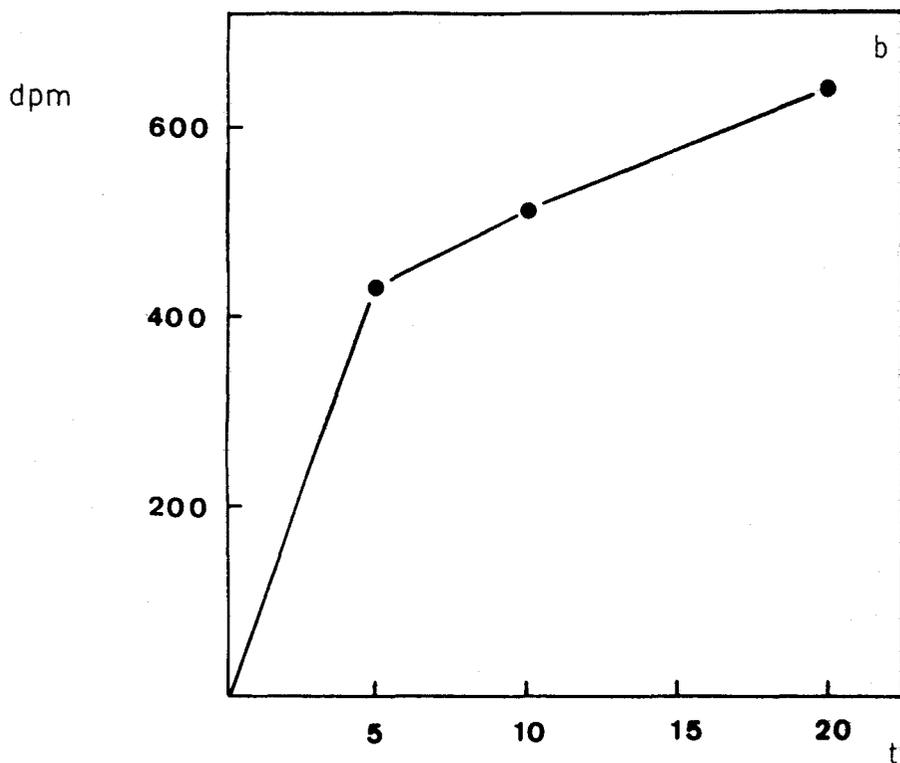
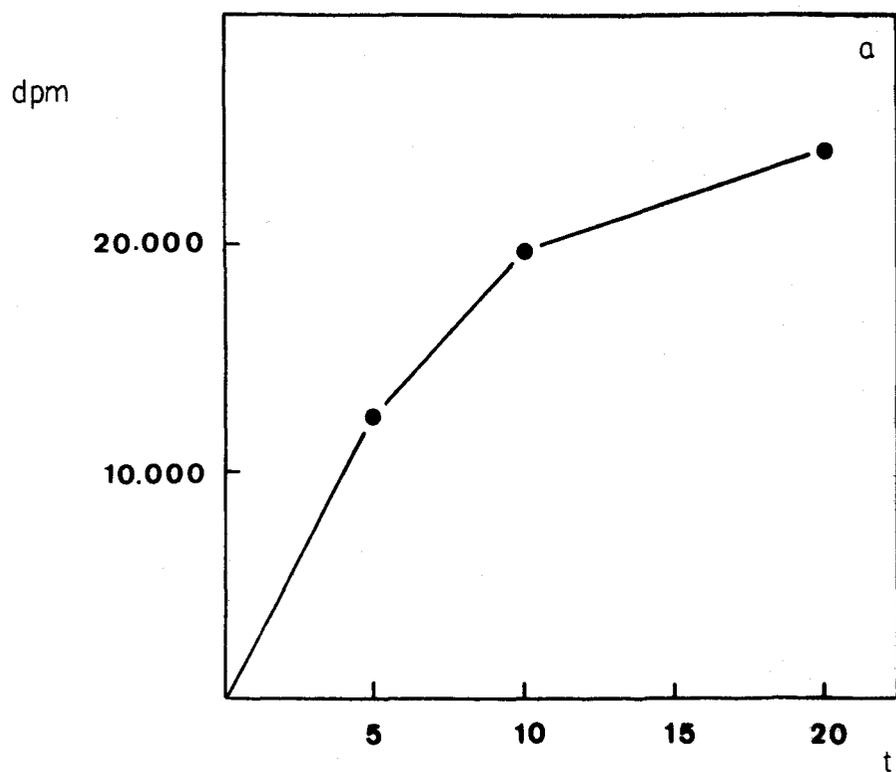


FIGURA 3.3. Productos solubles en ácido formados a partir de ác. (1-¹⁴C)-caprónico (a) y ác. (1-¹⁴C)-palmitico (b) frente a tiempo de incubación de hepatocitos. La concentración de ácido graso en el medio era de 0,4 mM.

de centelleo para determinar la radiactividad por centelleo líquido.

3.2.14. Expresión de resultados

Las medidas de CO_2 , triglicéridos y ácidos grasos marcados formados a partir de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$ cuando adicionamos bezafibrato al medio de incubación se expresan como % con respecto a un control (incubación de las células en ausencia de bezafibrato). En las gráficas se representa la media \pm error estándar de la media del % calculado en los diferentes experimentos realizados.

Cuando comparamos las medidas realizadas en ratas control y tratadas los resultados los expresamos: para adipocitos en nmol/mg peso seco, y para hepatocitos en $\text{nmol}/10^6$ células. Y el número dado es la media \pm error estándar de la media de los diferentes experimentos realizados. También se expresan como % de inhibición en la rata tratada con respecto al control.

Las medidas de CO_2 y productos solubles en ácido formados a partir de ácidos grasos marcados en hepatocitos se expresan también en $\text{nmol}/10^6$ células cuando comparamos ratas controles y tratadas, y como % con respecto a un control cuando adicionamos el bezafibrato al medio de incubación.

4. R E S U L T A D O S

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO "IN VITRO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA SINTESIS DE ACI- DOS GRASOS, TRIGLICERIDOS Y LA FORMACION DE CO₂ EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

Resultados obtenidos en este departamento (A. Ayala, 1984a) parecían sugerir un efecto inhibitor del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos, ya que el tratamiento de ratas con este fármaco impide la inducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfo-gluconato-deshidrogenasa del ciclo de las pentosas-fosfato producida por el ayuno-realimentación o por la administración de insulina.

El estudio del efecto del bezafibrato sobre la incorporación "in vivo" de agua tritiada en ácidos grasos (A. Ayala,

1984b) demostró que en los principales tejidos lipogénicos de la rata (tejido adiposo e hígado) el bezafibrato impide la inducción de la síntesis de ácidos grasos producida por las dos situaciones lipogénicas antes mencionadas.

Con objeto de establecer definitivamente si el efecto hipolipidémico del bezafibrato es debido a la inhibición en la síntesis de ácidos grasos, hemos estudiado el efecto "in vitro" de este fármaco sobre la lipogénesis en hepatocitos aislados de rata.

Las ratas utilizadas fueron sometidas a ayuno-realimentación, condición nutricional que produce una fuerte activación de la lipogénesis (Young y col., 1964; Timmers y Knittle, 1980). Esto nos permite la cuantificación de este proceso mediante la medida de la incorporación de glucosa-U-¹⁴C en ácidos grasos, triglicéridos y ¹⁴CO₂, así como su modificación al adicionar al medio de incubación distintas concentraciones de bezafibrato.

El estudio del efecto de este compuesto sobre la viabilidad de los hepatocitos indicó que a las concentraciones y tiempo utilizados en las incubaciones, la viabilidad celular no se ve afectada.

Los comprimidos de bezafibrato utilizados son poco solubles en el medio de incubación por lo que la disolución se realizó con la ayuda de ultrasonidos. También se utilizó bezafibrato

puro, fácilmente soluble y con el que se obtuvo los mismos resultados.

En las figuras 4.1 y 4.2 se expresan los resultados obtenidos en la producción de CO_2 y en la síntesis lipídica al adicionar al medio de incubación concentraciones de 1, 3 y 4 mM de bezafibrato, y se expresan como % con respecto a un control en ausencia de dicho compuesto.

En ellas se observa que cuando se adicionan concentraciones de 3 y 4 mM de bezafibrato se produce una disminución tanto de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos como de la formación de CO_2 . A la concentración más pequeña (1mM) se produjo una activación de todos los procesos cuantificados.

La disminución de la lipogénesis aumenta al aumentar la concentración de bezafibrato utilizada. Cuando se adiciona 4mM de bezafibrato al medio de incubación la disminución en la síntesis de ácidos grasos fue de 88,4%, la de la síntesis de triglicéridos del 78,8%, y la formación de CO_2 se vio inhibida en el 76,9%.

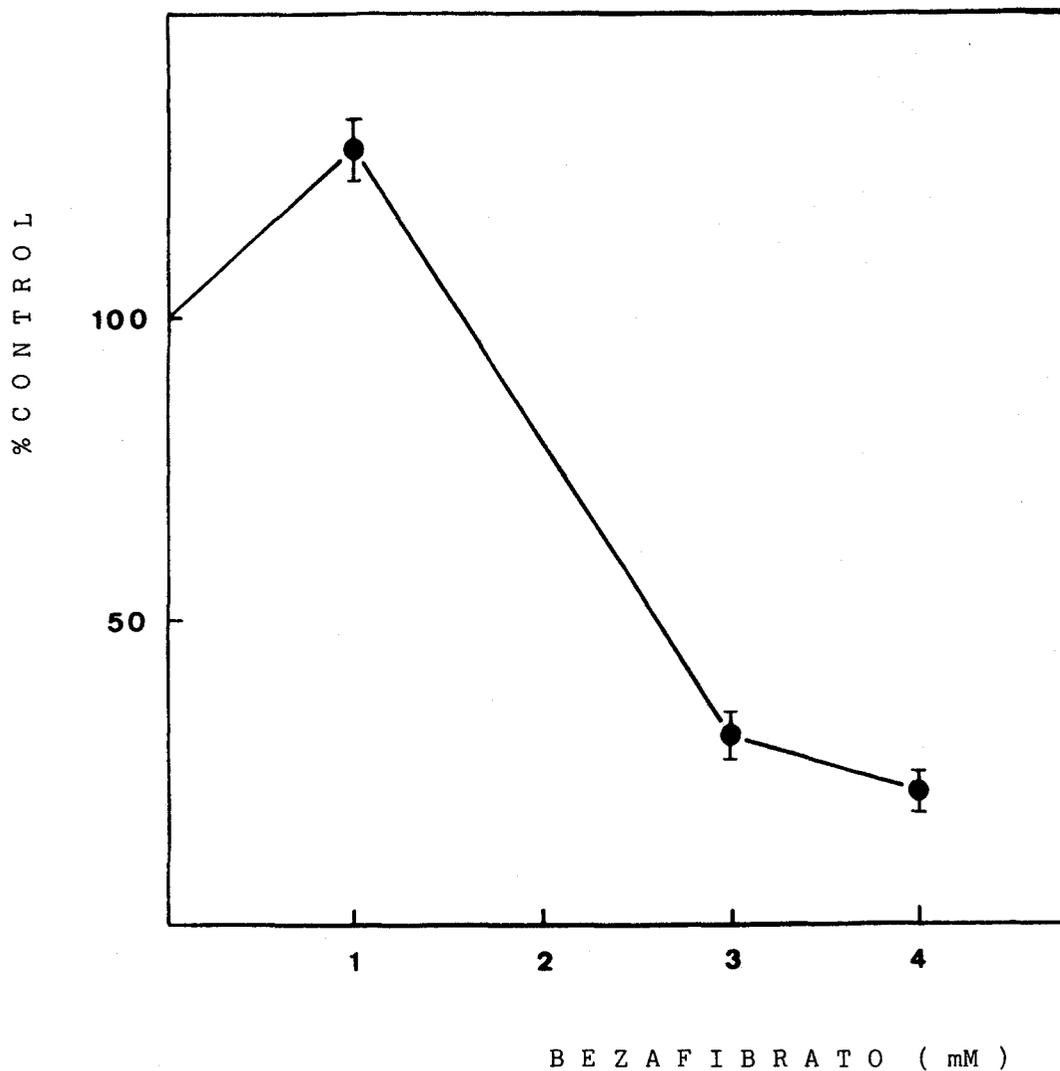


FIGURA 4.1. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre el $^{14}\text{CO}_2$ procedente de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$ en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 6 experimentos independientes \pm S.E.M.

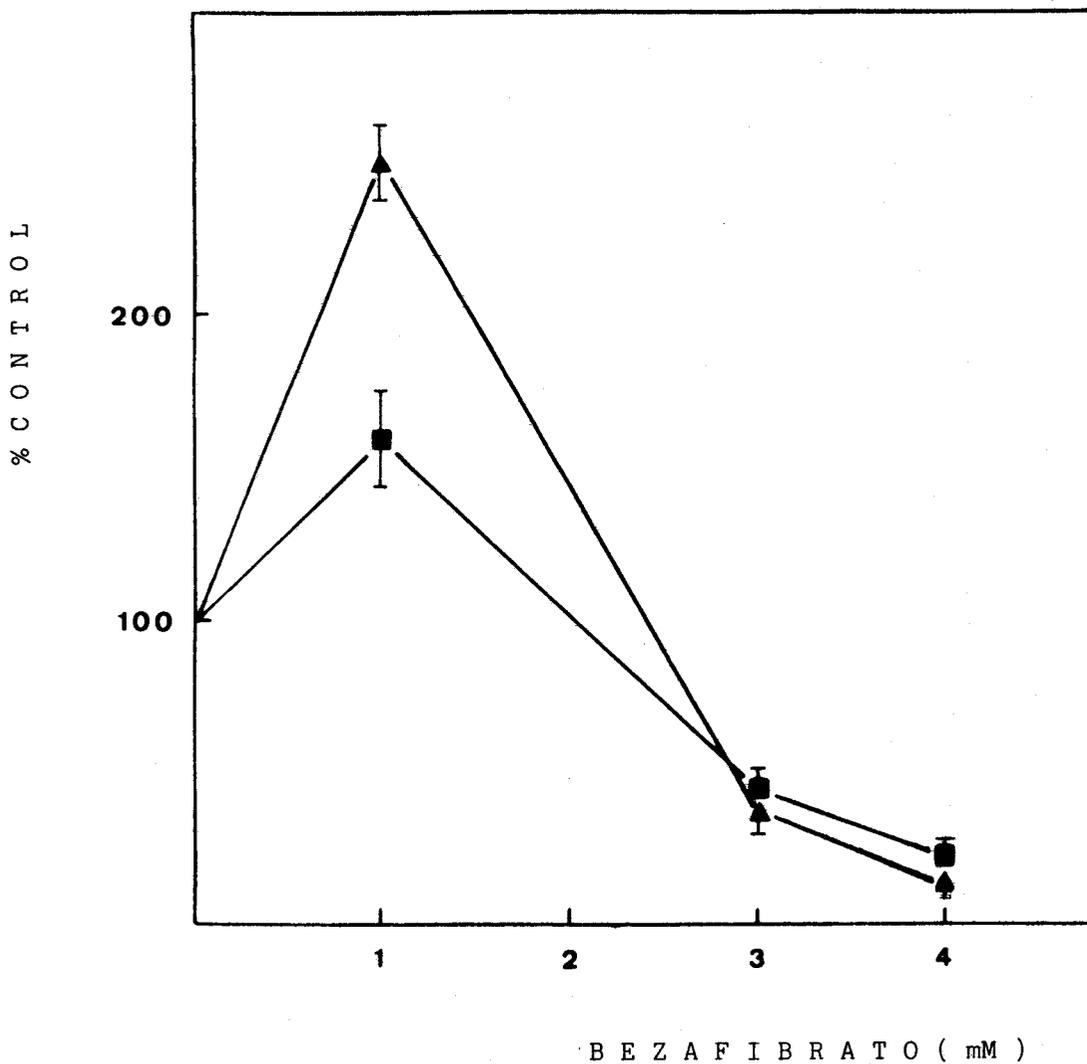


FIGURA 4.2. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos (▲) y síntesis de triglicéridos (■) a partir de glucosa-U-¹⁴C en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 6 experimentos independientes \pm S.E.M.

4.2. EFECTO "IN VITRO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA β -OXIDACION DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

El mecanismo de acción del efecto hipolipidémico del bezafibrato más ampliamente aceptado en la actualidad es la activación del sistema de β -oxidación peroxisomal (Lazarow, 1980). Numerosos datos de la bibliografía han demostrado la activación de este proceso mediante el tratamiento de ratas con bezafibrato y otras drogas hipolipidémicas (Lazarow, 1977; Lazarow y col., 1982).

Nosotros hemos investigado el efecto "in vitro" de este fármaco sobre la oxidación de ácidos grasos realizando los ensayos en las mismas condiciones utilizadas para el estudio del efecto de este compuesto sobre la síntesis lipídica.

Para valorar la β -oxidación hemos medido la formación de $^{14}\text{CO}_2$ y productos solubles en ácido (constituidos principalmente por cuerpos cetónicos). Para este estudio se eligieron como ácidos grasos el ácido ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-caprílico y el ácido ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-palmítico, ya que está bien establecida la diferencia en la oxidación de ácidos grasos dependiendo de la longitud de su cadena. Los ácidos grasos de cadena corta ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -caprílico) sólo pueden oxidarse en la mitocondria y la entrada en este orgánulo no precisa carnitina. Los ácidos grasos de cadena larga ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmítico) tienen tres posibles destinos en el hígado: oxidación mitocondrial

dependiente de carnitina (Fritz, 1961), oxidación peroxisomal (Lazarow, 1980) y esterificación para formar triglicéridos y fosfolípidos (Deuel, 1957; Mayes y Felts, 1967; McGarry y Foster, 1971).

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4.3 y 4.4. Las concentraciones de bezafibrato utilizadas fueron de 1 y 4 mM, obteniéndose iguales efectos con ambas concentraciones. Como puede observarse, no se detectaron variaciones significativas en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ ni en la formación de productos solubles en ácido a partir de ácido (1- ^{14}C)-caprílico. El $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir de ácido (1- ^{14}C)-palmítico experimentó un ligero aumento (122,5% con respecto al control para 1 mM de bezafibrato, y 125% cuando se adicionó 4 mM de bezafibrato). Y sólo los productos solubles en ácido formados a partir de este ácido aumentaron de forma notable (188,3% y 160,8% con respecto al control al adicionar 1 y 4 mM de bezafibrato respectivamente).

Así pues se produce un incremento en la β -oxidación del ácido palmítico (ácido graso de cadena larga) mientras que la oxidación del ácido caprílico (ácido graso de cadena corta) no varía.

Este aumento en la β -oxidación de ácidos grasos no puede ser debido a un incremento de la actividad enzimática ya que el estudio "in vitro" no permite el aumento de la síntesis de proteína en el corto período de la incubación.

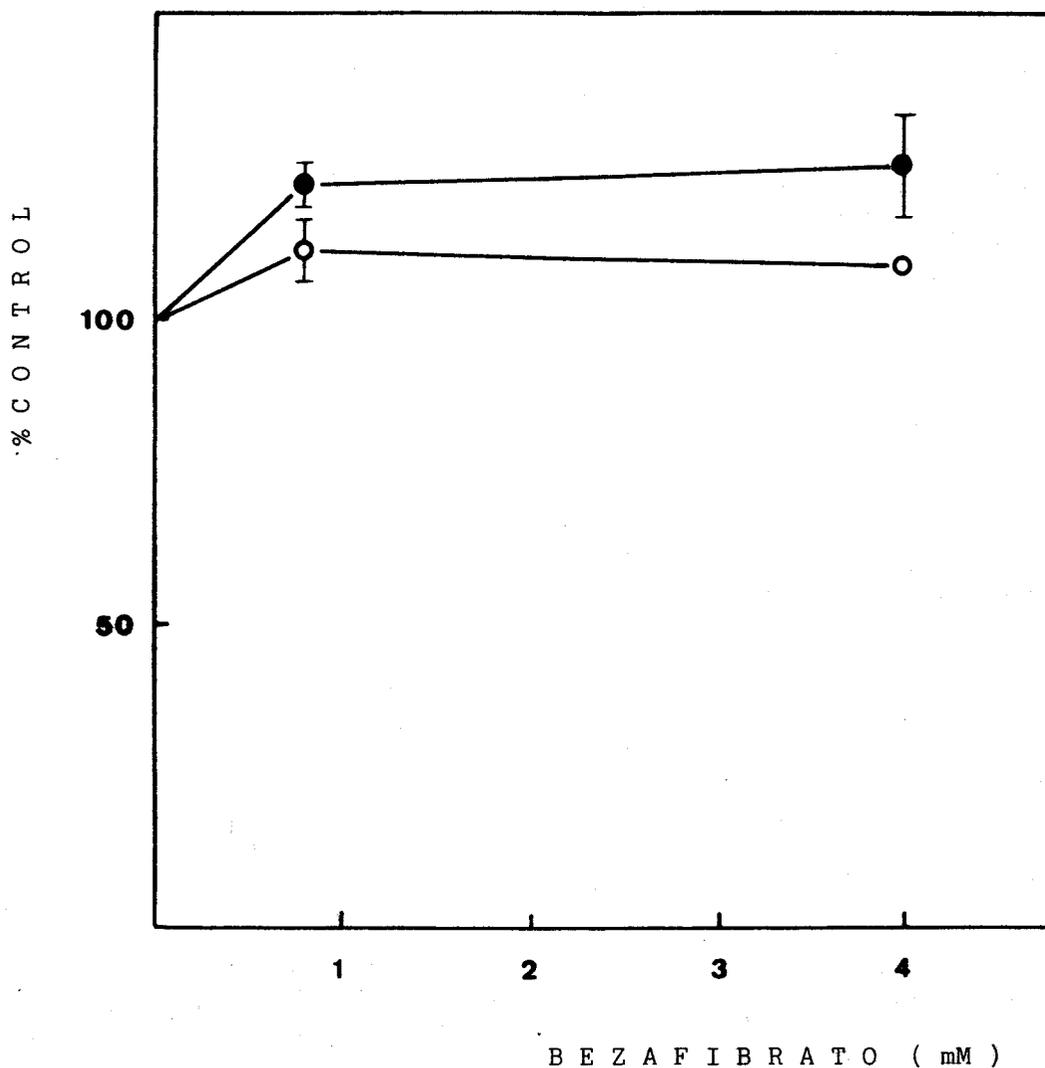


FIGURA 4.3. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre el $^{14}\text{CO}_2$ procedente de ác. (1- ^{14}C)-caprónico (○) y ác. (1- ^{14}C)-palmítico (●) en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 3 experimentos independientes \pm S.E.M.

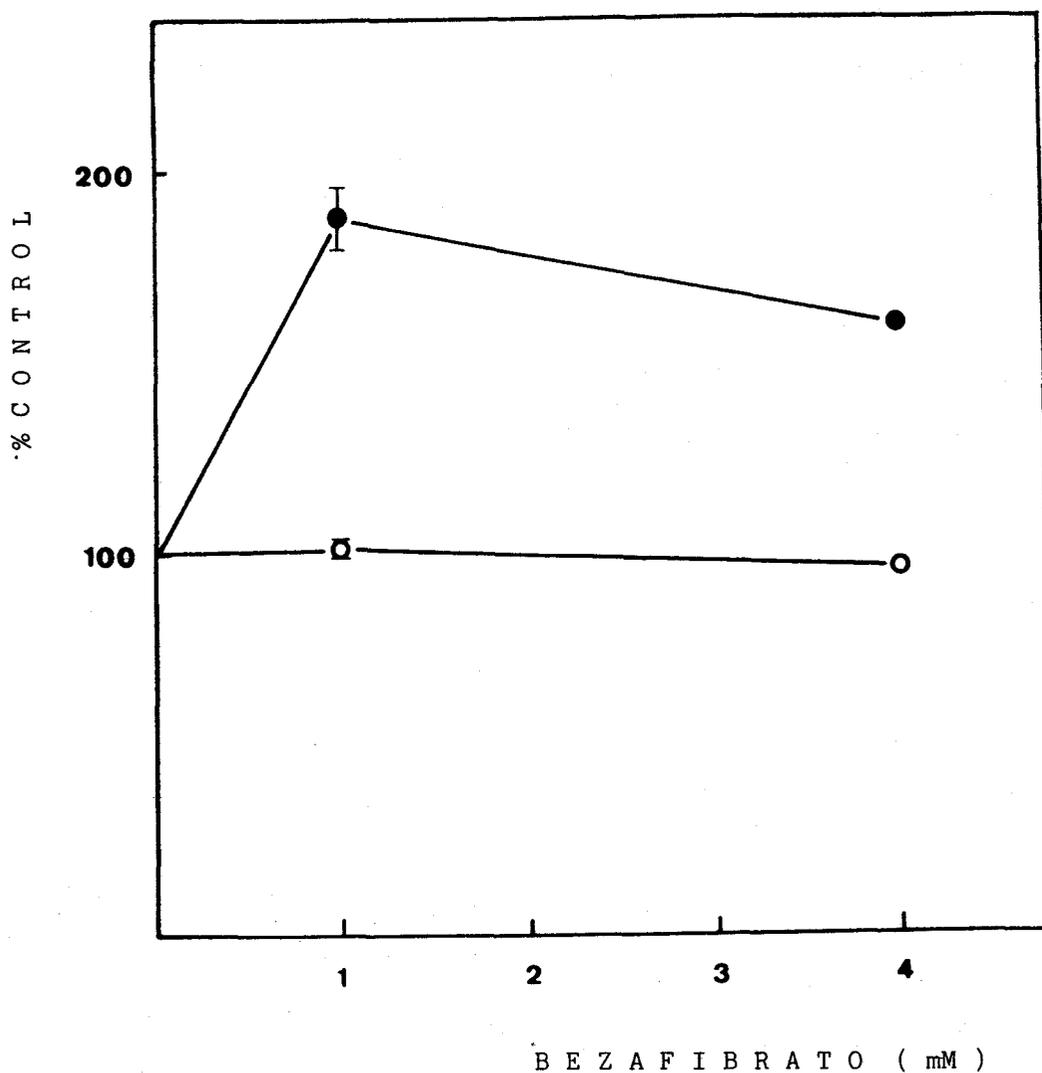


FIGURA 4.4. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la formación de P.S.A. a partir de ác. (1-¹⁴C)-caprónico (O) y ác.(1-¹⁴C)-palmítico (●) en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 3 experimentos independientes \pm S.E.M.

4.3. EFECTO "IN VITRO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS, TRIGLICERIDOS Y FORMACION DE CO₂ EN ADIPOCITOS AISLADOS DE RATA

El efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de lípidos ha sido estudiado también en otras células lipogénicas: adipocitos aislados de ratas ayunadas-realimentadas.

Previamente a la realización de los experimentos se estudió el efecto de este fármaco sobre la viabilidad de estas células, observándose que a las concentraciones y el tiempo utilizados en las incubaciones la viabilidad de los adipocitos no varía.

En las figuras 4.5 y 4.6 se recogen los resultados obtenidos de la síntesis de ácidos grasos, síntesis de triglicéridos y formación de ¹⁴CO₂ a partir de glucosa-U-¹⁴C al adicionar al medio de incubación 0,5, 2 y 4 mM de bezafibrato. Los resultados se expresan como % con respecto al control incubado en ausencia de dicho compuesto.

Como muestran las figuras, se produce una inhibición de la síntesis de lípidos, inhibición que aumenta al aumentar la concentración de bezafibrato. Así mientras que la concentración más pequeña utilizada (0,5 mM) prácticamente no afecta a la lipogénesis, un aumento en la concentración (2 y 4 mM) produce una disminución tanto de la síntesis de ácidos grasos y

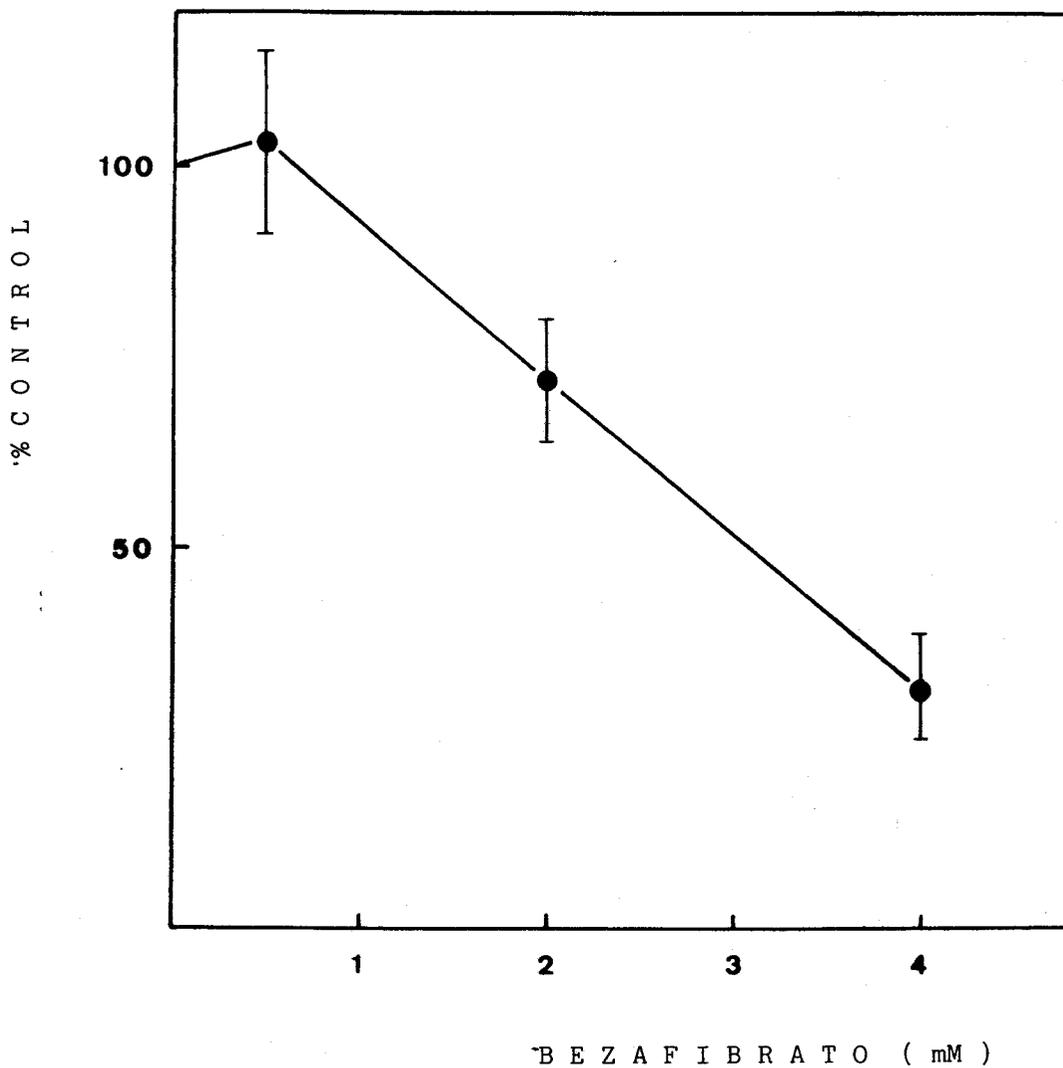


FIGURA 4.5. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre el $^{14}\text{CO}_2$ procedente de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$ en adipocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 8 experimentos independientes \pm S.E.M.

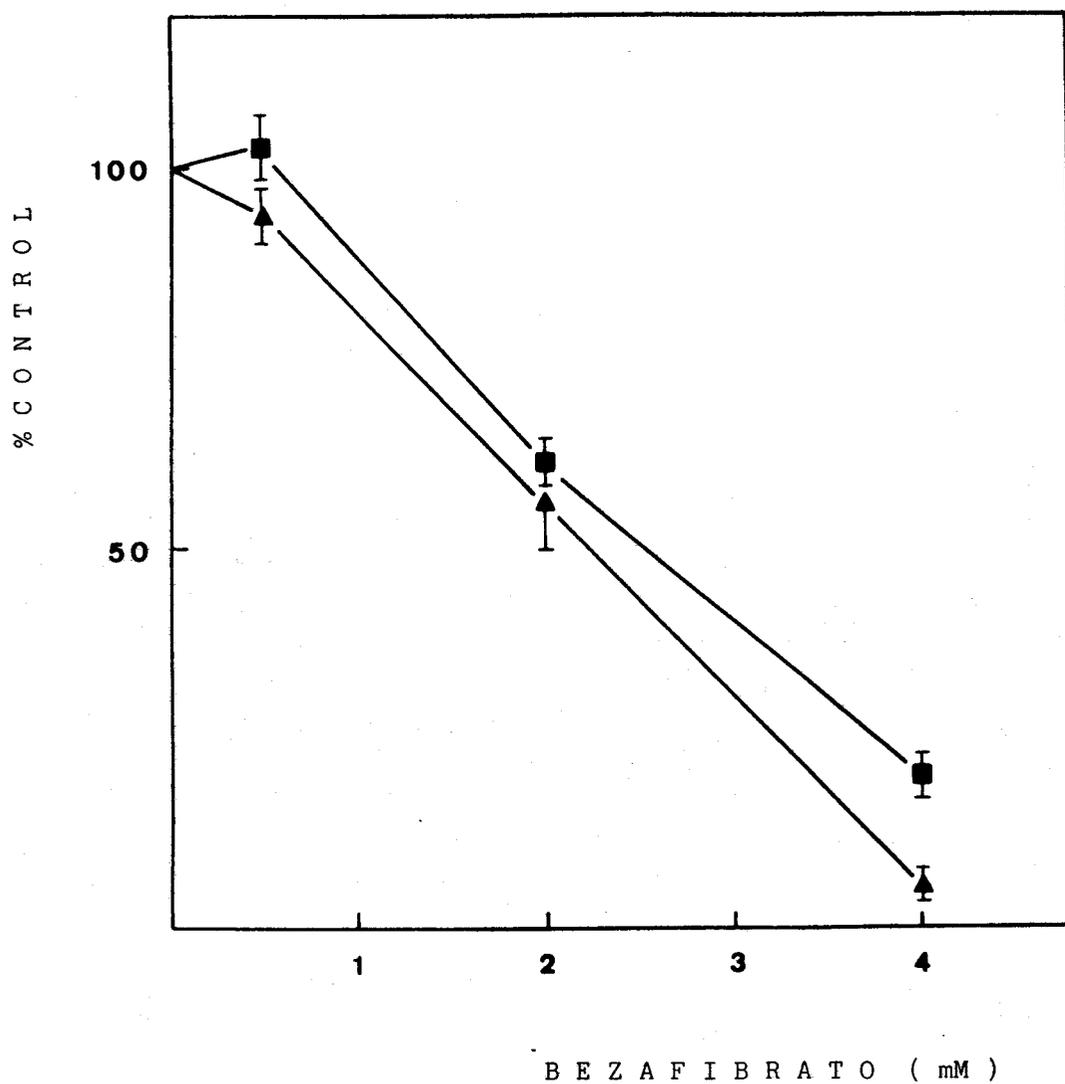


FIGURA 4.6. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos (▲) y síntesis de triglicéridos (■) a partir de glucosa-U-¹⁴C en adipocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 8 experimentos independientes \pm S.E.M.

triglicéridos como de la formación de CO_2 , obteniéndose con una concentración 4 mM una inhibición casi total.

4.4. EFECTO "IN VITRO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS Y TRIGLICERIDOS Y LA FORMACION DE CO_2 EN ACINI DE GLANDULA MAMARIA DE RATA

Adicionalmente al tejido hepático y adiposo existe otro tejido con alta capacidad lipogénica: la glándula mamaria en período de lactancia. Durante esta época, los acini de dicha glándula producen gran cantidad de ácidos grasos que forman parte de la leche. Por este motivo, hemos aislado acini de glándula mamaria de rata estudiándose el efecto del bezafibrato sobre la lipogénesis en dichas células.

Las ratas utilizadas tenían un período de lactancia de 15-18 días, fecha que se considera de máxima capacidad lactogénica, y fueron alimentadas ad libitum con dieta normal.

Los resultados obtenidos del efecto de distintas concentraciones de bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y la formación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$

se recogen en las figuras 4.7 y 4.8. En ellas se observa que a todas las concentraciones utilizadas (0,5, 2 y 4 mM) se produce una disminución de todos los procesos cuantificados, disminución que aumenta al aumentar la concentración de bezafibrato.

A la vista de estos resultados podemos afirmar que el bezafibrato tiene un efecto inhibitor sobre la síntesis de lípidos en acini aislados cuando adicionamos este fármaco al medio de incubación, siendo este efecto mayor cuanto mayor es la concentración de fármaco utilizado.

Todos estos resultados obtenidos del estudio del efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la lipogénesis en células aisladas corroboran los resultados anteriores obtenidos del estudio "in vivo" de la incorporación de agua tritiada en ácidos grasos (A. Ayala, 1984b), apoyando la hipótesis de que el mecanismo de acción del bezafibrato puede ser debido principalmente a una inhibición en la síntesis de ácidos grasos.

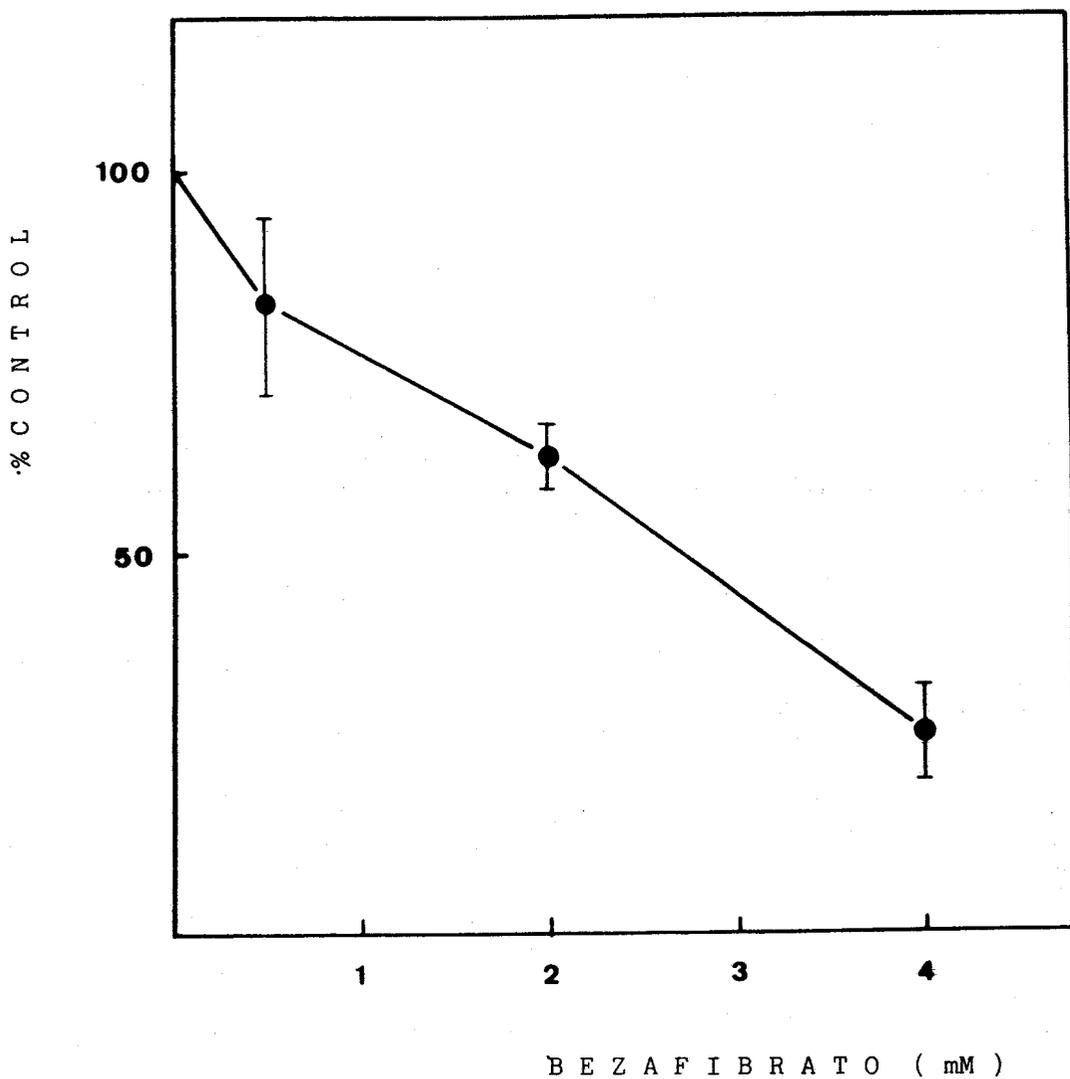


FIGURA 4.7. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre el $^{14}\text{CO}_2$ procedente de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$ en acini de glándula mamaria aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 4 experimentos independientes \pm S.E.M.

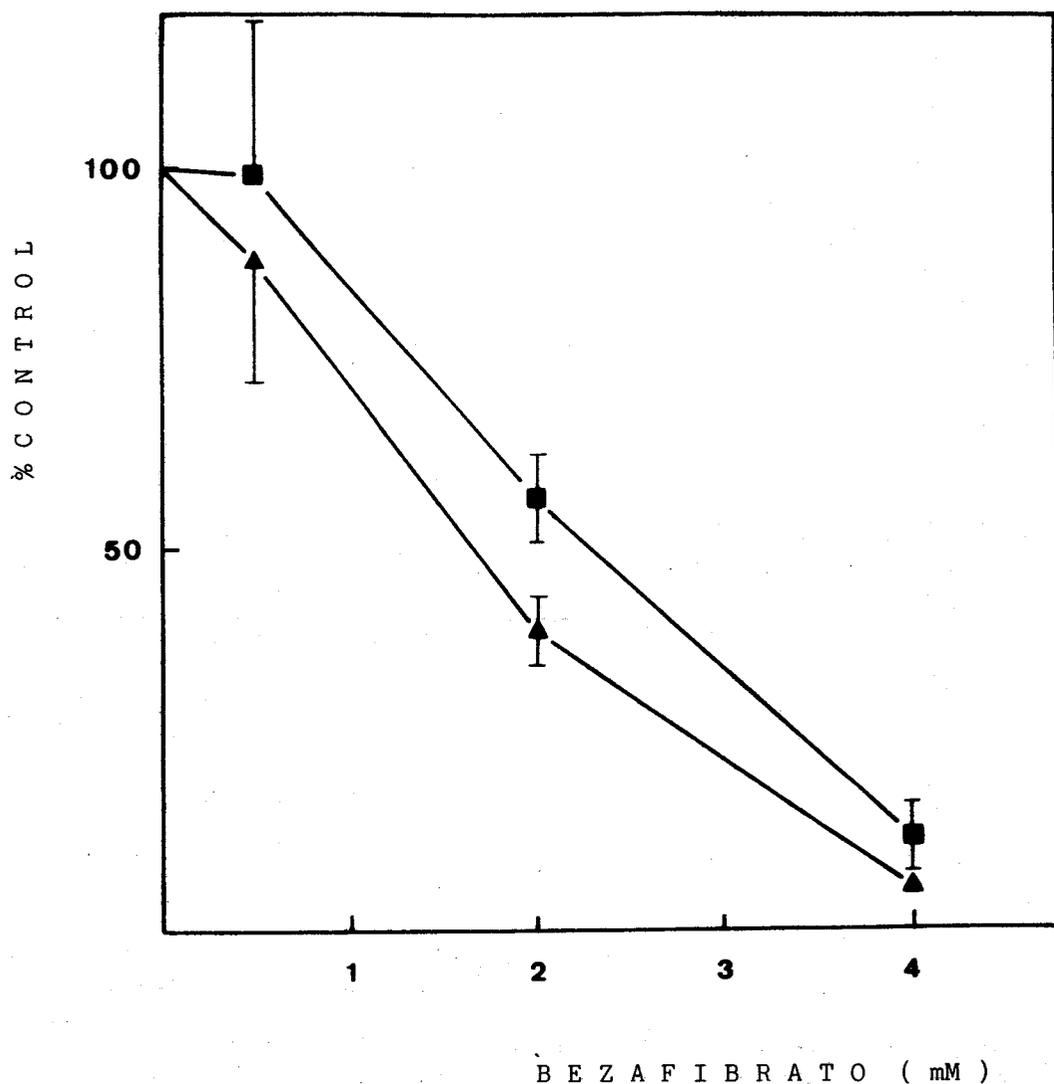


FIGURA 4.8. Efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos (▲) y síntesis de triglicéridos (■) a partir de glucosa-U-¹⁴C en acini de glándula mamaria aislados de rata. Los resultados se expresan en % con respecto a un control en ausencia de bezafibrato y son la media de al menos 4 experimentos independientes ± S.E.M.

4.5. EFECTO "IN VIVO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA SINTESIS DE ACI-
DOS GRASOS Y TRIGLICERIDOS Y LA FORMACION DE CO₂ EN HEPATOCITOS
AISLADOS DE RATA

Se estudió el efecto del tratamiento "in vivo" con bezafibrato sobre la síntesis lipídica en hepatocitos aislados de ratas ayunadas-realimentadas, comparándose estos valores con los resultados obtenidos en ratas controles (sin tratamiento con bezafibrato). A las ratas tratadas se les administró 400 mg/kg/día de bezafibrato los dos días previos a la realización del experimento.

Los resultados se recogen en la tabla 4.1. Como puede observarse, se obtuvo una inhibición casi total de la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa marcada en las ratas tratadas en relación con las ratas controles (inhibición del 93,4%), así como una inhibición en la síntesis de triglicéridos (64,3%) y la formación de CO₂ (37,2%).

Estos resultados corroboran experimentos anteriores (A. Ayala, 1984b) del efecto del tratamiento "in vivo" con bezafibrato sobre la incorporación de agua tritiada en ácidos grasos en hígado y tejido adiposo.

INCORPORACION GLUCOSA-U- ¹⁴ C A:	CONTROL (nmol/10 ⁶ células)	TRATADA BEZAFIBRATO (nmol/10 ⁶ células)
¹⁴ CO ₂	40,0 ± 3,4	25,1 ± 0,6 (62,8%)
TRIGLICERIDOS	19,9 ± 1,8	7,1 ± 1,2 (35,7%)
ACIDOS GRASOS	6,1 ± 0,9	0,4 ± 0,06 (6,6%)

TABLA 4.1. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la producción de ¹⁴CO₂, síntesis de ácidos grasos y síntesis de triglicéridos a partir de glucosa-U-¹⁴C en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en nmol/10⁶ células, y en % de la medida en rata tratada con respecto a rata control, y son la media de al menos 6 experimentos independientes ± S.E.M.

4.6. EFECTO "IN VIVO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA SINTESIS DE ACI-
DOS GRASOS Y TRIGLICERIDOS Y LA FORMACION DE CO₂ EN ADIPOCITOS
AISLADOS DE RATA

Hemos estudiado también el efecto del bezafibrato "in vivo" sobre la lipogénesis en adipocitos aislados de ratas ayunadas-realimentadas a las cuales se les administró 400 mg/kg/día de bezafibrato los dos días previos al experimento.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2. En ella se expresan los valores obtenidos en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y en la formación de CO₂ a partir de glucosa-U-¹⁴C en ratas controles y tratadas, así como el % de los valores obtenidos en ratas tratadas con respecto a los obtenidos en ratas controles. Como puede observarse, se produce inhibición en todos los procesos cuantificados: 66,7% de inhibición en la síntesis de ácidos grasos, 36,4% en la síntesis de triglicéridos, y 24,1% en la formación de CO₂.

Así pues, podemos afirmar que tanto "in vitro" como "in vivo" el bezafibrato ejerce un efecto inhibitor sobre la lipogénesis al estudiar este proceso en las principales células lipogénicas aisladas de rata.

INCORPORACION GLUCOSA-U- ¹⁴ C A:	CONTROL (nmol/mg peso seco)	TRATADA BEZAFIBRATO (nmol/mg peso seco)
¹⁴ CO ₂	0,29 ± 0,04	0,22 ± 0,02 (75,9%)
TRIGLICERIDOS	0,88 ± 0,15	0,56 ± 0,09 (63,6%)
ACIDOS GRASOS	0,60 ± 0,12	0,20 ± 0,03 (33,3%)

TABLA 4.2. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la producción de ¹⁴CO₂, síntesis de ácidos grasos y síntesis de triglicéridos a partir de glucosa-U-¹⁴C en adipocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en nmol/mg peso seco y en % de la medida en rata tratada con respecto a control, y son la media de al menos 8 experimentos independientes ± S.E.M.

4.7. EFECTO "IN VIVO" DEL TRATAMIENTO CON BEZAFIBRATO SOBRE LA β -OXIDACION DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

Se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía el efecto activador "in vivo" del bezafibrato y otros fármacos hipolipidémicos sobre la β -oxidación de ácidos grasos (Lazarow y de Duve, 1976; Lazarow, 1980). Nosotros hemos estudiado este efecto realizando los experimentos en las mismas condiciones en que se llevaron a cabo los estudios del efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la lipogénesis. Así, se han utilizado ratas sometidas a ayuno-realimentación y tratadas con 400 mg/kg/día de bezafibrato los dos días previos al experimento y que coinciden con los días de la realimentación.

Para valorar la oxidación se ha medido el $^{14}\text{CO}_2$ y los productos solubles en ácido formados a partir de ácido (1- ^{14}C)-caprílico y ácido (1- ^{14}C)-palmítico.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 4.3. En los resultados obtenidos en hepatocitos aislados de ratas controles (incubados en ausencia de bezafibrato) se observa que es mucho mayor (aproximadamente 20 veces) la oxidación de ácido caprílico que la de ácido palmítico.

En los resultados obtenidos en hepatocitos aislados de ratas tratadas con respecto a los de ratas controles se observa

INCORPORACION AC. (1- ¹⁴ C)-CAPRILICO A:	CONTROL (nmol/10 ⁶ células)	TRATADA BEZAFIBRATO (nmol/10 ⁶ células)
¹⁴ CO ₂	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1 (x1,1)
PSA	11,9 ± 1,2	39,4 ± 3,2 (x3,3)
¹⁴ CO ₂ + PSA	12,7 ± 1,2	40,3 ± 3,2 (x3,2)
INCORPORACION AC. (1- ¹⁴ C)-PALMITICO A:	CONTROL (nmol/10 ⁶ células)	TRATADA BEZAFIBRATO (nmol/10 ⁶ células)
¹⁴ CO ₂	0,13 ± 0,02	0,25 ± 0,02 (x1,9)
PSA	0,55 ± 0,06	4,23 ± 0,23 (x7,7)
¹⁴ CO ₂ + PSA	0,68 ± 0,06	4,48 ± 0,23 (x6,6)

TABLA 4.3. Efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la formación de ¹⁴CO₂ y productos solubles en ácido a partir de ác. (1-¹⁴C)-caprílico y ác. (1-¹⁴C)-palmítico en hepatocitos aislados de rata. Los resultados se expresan en nmol/10⁶ células, así como el aumento en rata tratada con respecto al control, y son la media de al menos 4 experimentos independientes ± S.E.M.

un pequeño aumento en la formación de CO_2 , y un aumento mucho mayor en la formación de productos solubles en ácido, activación que fue mayor cuando el sustrato fue ácido palmítico (aumento de aproximadamente 8 veces) que cuando se utilizó ácido caprílico (aumento de aproximadamente 3 veces). Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía y que postulan que el tratamiento de ratas con bezafibrato aumenta la β -oxidación peroxisomal, sólo activa para ácidos grasos de cadena larga (Lazarow, 1980).

5. DISCUSSION

5. DISCUSION

5.1. EFFECTO "IN VITRO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE EL METABOLISMO LI- PIDICO

Los estudios del efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la síntesis de lípidos utilizando diferentes células lipogénicas (hepatocitos, adipocitos y acini de glándula mamaria) muestran que este compuesto produce una notable inhibición tanto de la síntesis de triglicéridos como la de ácidos grasos (Figuras 4.1-4.2 y 4.5-4.8). Esta disminución de la síntesis lipídica es mayor a medida que se aumentan las concentraciones de bezafibrato en el medio de incubación. A concentraciones 4 mM se produce una inhibición casi total de la síntesis de ácidos grasos en todas las

células lipogénicas utilizadas.

El estudio del efecto "in vitro" del bezafibrato sobre la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos aislados, muestran un ligero aumento en la β -oxidación de ácidos grasos cuando el sustrato utilizado es ácido palmítico, mientras que la oxidación del ácido caprílico no se encuentra prácticamente afectada (Figuras 4.3 y 4.4). Es interesante destacar, por tanto, que el efecto activador del bezafibrato sobre la β -oxidación de ácidos grasos "in vitro" parece ser menor que su efecto inhibitorio sobre la síntesis de ácidos grasos y además, parece afectar únicamente a los ácidos grasos de cadena larga.

A pesar de que el mecanismo de acción del bezafibrato más ampliamente aceptado en la actualidad es el aumento de la β -oxidación, sobre todo la peroxisomal, existen algunos datos que postulan un efecto inhibitorio sobre una de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos. Así, Stegmeier y col. describen una inhibición "in vitro" de la actividad acetil-CoA carboxilasa de hígado de pollo por clofibrato y bezafibrato siendo esta inhibición dependiente de la concentración de fármaco adicionada, y correspondiendo el efecto mayor al bezafibrato. Dado que "in vivo" el bezafibrato es superior al clofibrato en cuanto a su efecto hipotriglicémidemante es muy probable que esta marcada inhibición

de la acetil-CoA carboxilasa por parte del bezafibrato contribuya de una forma muy directa a este efecto hipotrigliceridemiante (Stegmeier y col., 1980).

Existen otros datos en la bibliografía que describen una inhibición en la síntesis de lípidos por otro fármaco hipolipemiente, el clofibrato. Landriscina y col. (1975) indican una inhibición por clofibrato "in vitro" de la síntesis de ácidos grasos desde malonil-CoA, así como una inhibición mayor del sistema de elongación de cadena de ácidos grasos en microsomas. Greenspan y col. (1975) también describen un efecto inhibitor "in vitro" del clofibrato sobre la incorporación de glucosa y piruvato en ácidos grasos en adipocitos aislados de rata.

Hay que tener en cuenta que el aumento de la β -oxidación de ácido palmítico no puede deberse a variaciones en las cantidades de enzimas, ya que el corto período de tiempo utilizado en la incubación de las células "in vitro" (20 minutos) no permite variaciones en la síntesis de proteínas.

En los estudios de β -oxidación en hepatocitos controles (incubados en ausencia de bezafibrato) se puede observar que es mucho mayor la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ y de productos solubles en ácido formados a partir de caprilato que los formados a partir de pal-

mitato (Tabla 4.3). Esto es lógico, ya que en ratas sometidas a ayuno-realimentación con dieta glucídica, disminuye la razón glucagón:insulina, y en estas condiciones, el metabolismo lipídico en el hígado se dirige hacia la síntesis de ácidos grasos; la oxidación de ácidos grasos de cadena larga disminuye entonces, debido a la elevada concentración tisular de malonil-CoA que actúa como un potente inhibidor de la acil-carnitina transferasa I (McGarry y Foster, 1980). Esto coincide con los resultados obtenidos en los hepatocitos aislados de ratas controles, en los cuales la oxidación de ácido caprílico (valorada como CO_2 más productos solubles en ácido) es aproximadamente 20 veces la del ácido palmítico.

Por otra parte, nuestros resultados anteriores parecen demostrar que el mecanismo de acción primario del bezafibrato se debe a un efecto inhibidor sobre la síntesis de ácidos grasos (Fig. 4.2, 4.6 y 4.8). Aunque el lugar exacto en el cual este fármaco actúa no puede ser definitivamente establecido, sin embargo, se puede pensar, de acuerdo con los resultados de Stegmeier y col. (1980) que el bezafibrato podría tener una acción inhibidora sobre la acetil-CoA carboxilasa. Esta inhibición tendrá como consecuencia una disminución de los niveles intracelulares de malonil-CoA, con lo cual se producirá la desinhibición del sistema acil-carnitina transferasa I, produciéndose consecuentemente el aumento de la oxidación de

ácidos grasos de cadena larga (Fig. 4.3 y 4.4), lo que justifica el aumento de la β -oxidación encontrado para la oxidación del ácido palmítico en hepatocitos aislados en presencia de bezafibrato y el menor efecto encontrado para la oxidación de ácido caprílico en estas mismas condiciones.

5.2. EFFECTO "IN VIVO" DEL BEZAFIBRATO SOBRE EL METABOLISMO LIPI- DICO

Los resultados presentados del efecto del bezafibrato "in vivo" sobre el metabolismo lipídico mediante el estudio de la incorporación de glucosa-U- ^{14}C a $^{14}\text{CO}_2$, triglicéridos y ácidos grasos en células aisladas de ratas tratadas (Tablas 4.1 y 4.2) demuestran que este fármaco ejerce una acción inhibitoria sobre la lipogénesis en los dos tipos de células estudiados: adipocitos y hepatocitos.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente para el estudio del efecto "in vivo" de este fármaco sobre la incorporación de agua tritiada en ácidos grasos en tejido adiposo e hígado (A. Ayala, 1984b), donde con idéntico tratamiento se produjo una inhibición de la síntesis de ácidos gra-

95,2% en hígado y 88,4% en tejido adiposo.

El estudio del efecto "in vivo" del bezafibrato sobre la β -oxidación demuestra que el tratamiento con bezafibrato produce un aumento tanto de la oxidación de ácido caprílico como de ácido palmítico, siendo la activación mayor para este último (aproximadamente 8 veces) (Tabla 4.3). Estos resultados están de acuerdo con los descritos en la bibliografía donde se describe un aumento de la β -oxidación, principalmente la peroxisomal, producida por el tratamiento con bezafibrato (Lazarow y col., 1982).

El ácido palmítico, al ser un ácido graso de cadena larga, puede oxidarse tanto en la mitocondria como en el peroxisoma. Por lo tanto, un aumento de la β -oxidación del ácido palmítico, aproximadamente 2,5 veces mayor que el aumento observado para el caprilato, significa que puede haberse activado el sistema oxidativo peroxisomal y el sistema de transporte mitocondrial mediado por la acil-carnitina transferasa I. El aumento en la β -oxidación del caprilato significa, asimismo, que se ha activado también el sistema de β -oxidación mitocondrial.

En el estudio "in vivo" es posible un aumento de las actividades enzimáticas. Cuando comparamos los resultados obtenidos "in vitro" e "in vivo" sobre el sistema de β -oxidación de ácidos

grasos (Fig. 4.3 y 4.4, y tabla 4.3), se observa que la activación por el bezafibrato es mucho mayor "in vivo" que "in vitro". Así, mientras que "in vitro" el aumento parece sólo debido a una activación consecuente a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, "in vivo" participaría este mecanismo además de un aumento en las actividades de las enzimas que participan en la β -oxidación.

6. C O N C L U S I O N E S

=====

6. CONCLUSIONES

1) El bezafibrato tiene un efecto inhibitor "in vitro" sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en las principales células lipogénicas aisladas de rata (hepatocitos, adipocitos y acini de glándula mamaria). A concentración 4 mM el efecto inhibitor sobre la síntesis de ácidos grasos es mayor del 85% en todas las células utilizadas.

2) La incubación de hepatocitos en presencia de bezafibrato produce un efecto activador sobre la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga. A concentración 4 mM de bezafibrato se produce un aumento de la formación de productos solubles en ácido del 160%.

3) El efecto activador "in vitro" del bezafibrato sobre

la β -oxidación de ácidos grasos es menor que el efecto inhibitor de este fármaco "in vitro" sobre la síntesis de ácidos grasos.

4) El tratamiento de ratas con bezafibrato tiene un efecto inhibitor del 93% y 64% sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos respectivamente en hepatocitos aislados de rata, y del 67% y 36% sobre la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos respetivamente en adipocitos aislados de rata.

5) El tratamiento de ratas con bezafibrato tiene un efecto activador sobre la β -oxidación de ácidos grasos en hepatocitos aislados de rata.

6) El efecto activador "in vivo" del bezafibrato sobre la β -oxidación es mayor para ácidos grasos de cadena larga (aumento de 6,6 veces con respecto al control) que para ácidos grasos de cadena corta (aumento de 3,2 veces).

7) El efecto activador del bezafibrato sobre la β -oxidación de ácidos grasos "in vivo" es mayor que su efecto "in vitro" sobre este proceso.

8) El efecto hipolipemiante del bezafibrato es debido a una inhibición en la síntesis de ácidos grasos, además del efecto activador ya descrito sobre la β -oxidación de ácidos grasos.

7. B I B L I O G R A F I A



7. BIBLIOGRAFIA

AAS, M. y BREMER, J. (1968). Biochim. Biophys. Acta, 164, 157

AAS, M. (1971). Biochim. Biophys. Acta, 231, 32

ARNTZ, H.-R., LEONHARDT, H., LANG, P.D. y VOLLMAR, J. (1980). En Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 125, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.

AYALA, A. (1984a). Tesina de licenciatura. Dpto Bioquímica, Universidad de Farmacia, Sevilla.

AYALA, A. (1984b). Enviado para publicación.

BEINERT, H. (1963). En "The Enzymes" (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., eds.), 2ª ed., vol. 7, p. 447, Academic Press, New York

- BERNDT, J., GAUMER, R., y Still, J. (1978). *Atherosclerosis*, 30, 147.
- BERRY, M.N., y FRIEND, D.S. (1969). *Cell. Biol.*, 43, 506.
- BOLZANO, K., KREMLER, F., SCHELLENBERG, B., y SCHLIERF, G. (1980). *En Lipoproteins and Coronary Heart Disease* (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 130, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.
- BREMER, J. y WOJTCZAK, A.B. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 515.
- BRONFMAN, M., INESTROSA, N.C. y LEIGHTON, F. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 1030.
- BROWNSEY, R.W. (1981). *Biochem. Soc. Trans.*, 9, 515.
- CHEN, R.F. (1967). *J. Biol. Chem.*, 242, 173-181.
- COOPER, T.G. y BEEVERS, H. (1969). *J. Biol. Chem.*, 244, 3514.
- CORNELL, N.W., LUND, P., HEMS, R. y KREBS, H.A. (1973). *Biochem. J.*, 134, 671.
- DE DUVE, C. y BAUDHUIN, P. (1966). *Physiol Rev.*, 46, 323.
- DENTON, R.M., BROWNSEY, R.W. y BELSHAM, G.J. (1981). *Diabetología*, 21, 347.
- DEUEL, H.J., Jr. (1957). *En The Lipids: their Chemistry and Biochemistry*, vol. 3, p. 120, John Wiley, New York.

- FÀHIMI, H.D., KALMBACH, P., STEGMEIER, K. y STORK, H. (1980). En Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H., Lang, P.D., y Schettler, G., eds.), p. 64, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.
- FELLIN, R., MARTINI, S., CREPALDI, G., CAPURSO, A., AGOSTINO, C.D., MONTAGUTI, U., CELIN, D., DESCOVICH, G.C., AVELLONE, G., NOTARBAR-TOLO, A., SENIN, U., MANNARINO, E. y MANTOVANI, E. (1980). VII International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, Milan. Abstract Book, 167.
- FITCH, W.M. y CHAIKOFF, I.L. (1960). J. Biol. Chem. 235, 554.
- FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I. y LEES, R.S. (1976). New Engl. J. Med., 276, 34, 94, 148, 215, 273.
- FRITZ, I.B. (1961). Physiol. Rev., 41, 52.
- GEELEN, M.J.H., BEYNEN, A.C., CHRISTIANSEN, R.Z., LEPREAU-JOSE, M.J. y GIBSON, D.M. (1978). FEBS Lett., 95, 326.
- GOFMAN, J.W., GLAZIER, F., TAMPLIN, A., STRISOWER, B. y DELALLA, O. (1954). Physiol. Rev., 34, 589.
- GOODRIDGE, A.G. (1972). J. Biol. Chem., 247, 6946.
- GORDON, T., CASTELLI, W.P., HJORTLAND, M.C. y col. (1977). Am. J. Med., 62, 707.
- GREENSPAN, M.D., GERMERSHAUSEN, J.I. y MACKOW, R. (1975). Biochim. Biophys. Acta, 380, 190.

- GRETEN, H., LANG, P.D. y SCHETTLER, G. (1980). En Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p.1, Gerhard Witzstrock Publishig House, New York.
- HARTMANN, G. y LYNEN, F. (1961). En The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., eds.), 2ª ed., vol. 5, p. 381, Academic Press, New York.
- HASHIMOTO, T., ISANO, H., IRITANI, N. y NUMA, S. (1971). Eur. J. Biochem., 24, 128.
- HASHIMOTO, T. y NUMA, S. (1971). Eur. J. Biochem., 18, 319.
- HATCH, F.T., LINDGREN, F.T., ADAMSON, G.L., JENSEN, L.C., WONG, A. W. y LEVY, R.I. (1973). J. Lab. Clin. Med., 81, 946.
- KAFFARNIK, H., SCHNEIDER, J., SCHUBOTZ, R., MUHLFELLNER, O., MUHLFELLNER, G., HAUSMANN, L. y ZOFEL, P. (1978). En International Conference on Atherosclerosis (Carlson, L., Paoletti, R. y Weber, G., eds.), p. 129, Raven Press, New York.
- KATZ, J., WALSH, P.A. y VAN DE VELDE, R.L. (1974). J. Biol. Chem., 249, 7348.
- KLOSE, G., BEHRENDT, J. y GRETEN, H. (1980). En Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 182, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.
- KOPEC, B. y FRITZ, I.B. (1973). J. Biol. Chem., 248, 4069.

- KORNACKER, M.S. y LOWESTEIN, J.M. (1964). *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 490
- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K. (1932). *Hoppe-Seyler's Z.*, 210, 33.
- KUSHWAHA, R.S. y HAZZARD, W.R. (1977). *Ann. Intern. Med.*, 87, 500.
- LANDRISCINA, C., GNONI, V. y QUAGLIARIELLO, E. (1975). *Biochem. Med.*, 12, 356.
- LAZAROW, P.B. y DE DUVE, C. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2043.
- LAZAROW, P.B. (1977). *Science*, 197, 580.
- LAZAROW, P.B. (1978a). *J. Biol. Chem.* 253, 1522.
- LAZAROW, P.B. (1978b). En *International Conference on Atherosclerosis* (Carlson, L., Paoletti, R. y Weber, G., eds.) p. 15, Raven Press, New York.
- LAZAROW, P.B. (1980). En *Lipoproteins and Coronary Heart Disease* (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 96, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.
- LAZAROW, P.B., SHIO, H. y LEROY-HOUYET, M.A. (1982). *J. Lip. Res.*, 23, 317.
- LEES, R.S., HATCH, F.T. (1963). *J. Lab. Clin. Med.*, 81, 946.
- LEONHARDT, H. y ARNTZ, H.-R. (1980). En *Lipoproteins and Coronary Heart Disease* (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 192, Gerhard Witzstrock Publishig House, New York.

LIDGREN, F.T., JENSEN, L. C. y HATCH, F.T. (1972). En Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism (Nelson, G.J., ed.), p. 181, Wiley-Interscience, New York.

MANNAERTS, G.P., DEBEER, L.J., THOMAS, J. y DE SCHEPPER, P.J. (1979). J. Biol. Chem., 254, 4586

MARKWELL, M.A.K., Mc GROARTY, E.J., BIEBER, L.L. y TOLBERT, N.E. (1973). J. Biol. Chem., 248, 3426.

MATSUHASHI, M., MATSUHASHI, S. y LYNEN, F. (1964). Biochem. Z., 340, 263.

MAYES, P.A. y FELTS, J.M. (1967). Nature, 215, 716.

McGARRY, J.D. y FOSTER, D.W. (1971). J. Biol. Chem., 246, 6247.

McGARRY, J.D., MANNAERTS, G.P. y FOSTER, D.W. (1977). J. Clin. Invest., 60, 265.

McGARRY, J.D., LEATHERMAN, G.F. y FOSTER, D.W. (1978a). J. Biol. Chem., 253, 4128.

McGARRY, J.D., TAKABAYASHI, Y. y FOSTER, D.W. (1978b). J. Biol. Chem., 253, 8294.

McGARRY, J.D. y FOSTER, D.W. (1980). Ann. Rev. Biochem., 49, 395.

MIDDLETON, B. (1978). En Biochemical and Clinical Aspects of Ketone Body Metabolism (Söling, H.-D. y Seufert, C.-D., eds.), p. 1, Stuttgart: Georg Thieme.

MILLER, G.E. y MILLER, J.E. (1975). *Lancet*, 1, 16.

MOSS, J., YAMAGISHI, M., KLEINSCHMIDT, A.K. y LANE, M.D. (1972).
Biochem., 11, 3779.

NAKANISHI, S. y NUMA, S. (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68,
2288.

NOBLE, R.P., HATCH, F.T., MAZRIMAS, J.A., LINDGREN, F.T., JENSEN,
L.C., ADAMSON, G.L. (1969). *Lipids*, 4, 55.

OLSSON, A.G., ROSSNER, S., WALLDIUS, G., CARLSSON, L. y LANG, P.D.
(1977). *Atherosclerosis*, 27, 279.

OLSSON, A.G. Y LANG, P.D. (1978). *Atherosclerosis*, 31, 429.

OLSSON, A.G. (1980). *En Lipoproteins and Coronary Heart Disease*
(Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 139, Gerhard
Witzstrock Publishing House, New York.

OSMUNDSEN, H., NEAT, C.E. y NORUM, K.R. (1979). *FEBBS Lett.*, 99,
292.

OSUMI, T. y HASHIMOTO, t. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*,
83, 479.

PAPADOPOULUS, N.M. y KINTZIOS, J.A. (1969). *Anal Biochem.*, 30,
421.

PERUTZ, M.F. y POYART, C. (1983). *Lancet*, 2, 881.

PLATE, C.A., JOSHI, V.C., SEDWICH, B. y WAKIL, S.J. (1968). *J. Biol.*
Chem., 243, 5439.

- RHOADS, G., GULBRANDSEN, C.L. y KAGAN, A. (1976). N.Engl. J. Med., 294, 293.
- ROBINSON, A.M. y WILLIAMSON, D.H. (1977). Biochem. J., 164, 749.
- RODBELL, M. (1964). J. Biol. Chem., 239, 375.
- RODBELL, M. (1967). J. Biol. Chem., 242, 5744.
- RUSH, W.R. y FEARS, R. (1982). Biochem. Pharmacol., 31, 173.
- SCHWARTZKOPFF, W., LULEY, C., SCHEFFLER, W., LEHMANN, L.W., SCHILLING, A. y WEGESCHIEDER, K. (1982). Med. Welt., 33, 631.
- SHRAGO, E. y LARDY, H.A. (1966). J. Biol. Chem., 241, 663.
- SILPANANTA, P. y GOODRIDGE, A.G. (1971). J. Biol. Chem., 266, 5754.
- SPENCE, J.T. y PITOT, H.C. (1982). Eur. J. Biochem., 128, 15.
- STEGMEIER, K., STORK, H., LENZ, H., LEUSCHNER, F. y LIEDE, V. (1980). EN Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H., Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 76, Gerhard Witzstrock Publishing House, New York.
- STERN, J.R. (1961). En The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., eds.), 2ª ed., vol. 5, p. 511, Academic Press, New York.
- STORK, H. y LANG, P.D. (1975). En Lipids, Lipoproteins and Drugs (Kritchevsky, D., Paoletti, R. y Holmes, w., eds.), p. 485, Plenum Press, New York.

- TEPPERMAN, J. y TEPPERMAN, H.M. (1958). Amer. J Physiol., 193, 55.
- TIMMERS, K. y KNITTLE, J.L. (1980). J. Nutr., 110, 1176.
- TUBBS, P.K. y GARLAND, P. B. (1964). Biochem. J., 93, 550.
- VAN TOL, A. y HULSMANN, W.C. (1970). Biochim. Biophys. Acta, 223, 416.
- WAKIL, S.J. (1963). En The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myr-
bäck, K., eds.), 2ª ed., vol.7, p.97, Academic Press, New York.
- WECHSLER, J.G., HUTT, V., KLOR, H.-U., BODE, G. y DITSCHUNEIT, H.
(1980). En Lipoproteins and Coronary Heart Disease (Greten, H.,
Lang, P.D. y Schettler, G., eds.), p. 119, Gerhard Witzstrock Pu-
blishing House, New York.
- WIELAND, O., NEUFELDT, I., NUMA, S. y LYNEN, F. (1963). F. Bio-
chem. Z., 336, 455.
- WITTERS, L.A., MORIARTY, D. y MARTIN, D.B. (1979). J. Biol. Chem.,
254, 6644.
- YOUNG, J.W., SHRAGO, E. y LARDY, H.A. (1964). Biochem., 3, 1687.
- ZAMMIT, V.A. y CORSTORPHINE, C.G. (1982). Biochem. J., 208, 783.
- ZIMMERMANN, R., HOFFRICHTER, A., WALTER, E., EHLERS, W. ANDRASSY,
K., LANG, P.D., SCHLIERF, G., WEBER, E. y BARTH, P. (1977). Dtsch.
Med. Wschr., 102, 509.
- ZIMMERMANN, R., EHLERS, W., WALTER, E., HOFFRICHTER, A., LANG, P.D.,
ANDRASSY, K. y SCHLIERF, G. (1978). Atherosclerosis, 29, 477.