
Estudio analítico y modificación experimental del metabolismo peroxisómico

J.I. Monreal, A. Rivero, P. De Pablo, M.J. Gil, A. González, M.M. Calonge

INTRODUCCIÓN

El peroxisoma es el organelo celular en el que asientan algunas vías del metabolismo lipídico y de algunos aminoácidos y, de forma destacada, numerosas actividades enzimáticas de tipo oxidasa. Los peroxisomas, caracterizados por De Duve en 1960¹, llevan a cabo gran variedad de funciones, como son: catabolismo de ácidos grasos de cadena muy larga, de ácido pipercolico, de ácidos dicarboxílicos, y del ácido fitánico, y biosíntesis de plasmalógenos y de ácidos biliares.

En años recientes se han caracterizado un grupo de enfermedades de origen genético derivadas del déficit en el número y actividad bioquímica de los peroxisomas². Por otra parte en experimentación animal se han observado que ciertos fármacos (clofibrato, nafenopina, bezafibrato, ácido acetilsalicílico, etc.) inducen proliferación peroxisómica³. El clofibrato fue introducido en 1962 como agente hipolipemiente y se observó que en ratas que ingerían esta droga proliferaba el número de peroxisomas. El mismo efecto se ha comprobado posteriormente con otros xenobióticos.

Al haberse comprobado que algunos fármacos de uso común como analgésicos e hipolipemiantes se comportan como pro-

liferadores peroxisómicos, consideramos que esta expansión del espacio peroxisómico puede ir asociada a la activación de las vías metabólicas que asientan en este organelo. Los objetivos son:

1. Conocimiento de la acción de fármacos hipolipemiantes y antiinflamatorios no esteroideos (AINE) sobre el metabolismo peroxisómico. Seleccionaremos compuestos de efecto no estudiado junto con otros ya probados por otros autores con resultados contradictorios.

2. Valoración de enzimas de distintas vías, localizadas en la matriz y en el «core» del peroxisoma, así como la posible inducción enzimática por los tratamientos administrados.

3. Comparación de efectos sobre el hígado, como órgano central, y cerebro, por su aislamiento, por ser tejidos especialmente afectados en enfermedades de origen peroxisómico.

4. Extensión del estudio al estado peroxidativo del organismo y al metabolismo lipídico.

5. Valoración de la expresión del protooncogen c-myc en animales tratados, dada la posible carcinogenicidad de algunos de los compuestos que vamos a emplear.

| | <i>n</i> | <i>Tto</i> | <i>Dosis diaria</i> | <i>Vía adm</i> | <i>Duración Tto</i> | <i>Peso</i> |
|---------|----------|-------------|---------------------|----------------|---------------------|-------------|
| Grupo 0 | 10 | CMC + Tween | 10 ml/kg | v.o | 15 días | Diario |
| Grupo 1 | 10 | CLO (Sigma) | 250 mg/kg | v.o | 15 días | Diario |
| Grupo 2 | 10 | PRO (Sigma) | 250 mg/kg | v.o | 15 días | Diario |
| Grupo 3 | 10 | AAS | 500 mg/kg | v.o. | 15 días | Diario |
| Grupo 4 | 10 | DIF (Sigma) | 50 mg/kg | v.o. | 15 días | Diario |

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 ratas Wistar macho de 200 g de peso aproximadamente, procedentes del animalario de la Universidad de Navarra.

Se constituyeron cinco grupos de animales que fueron tratados con clofibrato (CLO), probucol (PRO); ácido acetilsalicílico (AAS), diflunisal (DIF), vehiculados en carboximetilcelulosa (CMC) de acuerdo con la siguiente pauta:

Tras el tratamiento se obtuvo sangre de la que se separó el plasma, el hígado y el cerebro, de los que se obtuvieron los peroxisomas y mitocondrias por ultracentrifugación en gradiente de densidad⁴.

Las determinaciones analíticas fueron:

1. En las muestras obtenidas de hígado y cerebro se realizaron las siguientes determinaciones automatizadas en el equipo Cobas Fara II: Proteínas, actividad Catalasa, actividad Urato Oxidasa, actividad Tiolasa, actividad Monoamino Oxidasa y actividad Citocromo C Oxidasa.

2. En plasma, al término del experimento se determinaron en el autoanalizador Cobas Fara II e Hitachi 717: dienos conjugados, colesterol total, triglicéridos, HDL-colesterol y actividad superóxido dismutasa.

3. En cinco ratas se extrajo el RNA hepático y cerebral y se realizó un Northern Blot e hidradación con sondas de oligonucleótidos para el oncogén c-myc y la enzima Acil CoA Oxidasa.

En cada grupo experimental se determinaron, como parámetros estadísticos, la media, la desviación típica, y el coeficiente de variación usando el programa Sigma 1.00. Debido a la heterogeneidad de los

resultados se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. Peso

No se observó una variación significativa de peso entre ratas sometidas a los distintos tratamientos. El peso cerebral se redujo significativamente en los animales tratados con AINEs y se encontró un aumento significativo en el peso del hígado de las ratas tratadas con clofibrato.

2. Estudio peroxisómico

- Actividad Catalasa:

Hígado: se encontró un aumento significativo de la actividad hepática en los grupos tratados con AAS, DIF, PRO respecto al control.

Cerebro: se encontró que los hipolipemiantes CLO y PRO producen un aumento significativo respecto al control.

- Actividad Urato Oxidasa:

Hígado: el grupo de los AINEs aumentaron la actividad de forma significativa, y los dos hipolipemiantes también lo hicieron aunque en menor grado.

Cerebro: en el cerebro la relación de actividades entre distintos tratamientos fue: AAS > PRO > CLO > DIF > CMC.

- Actividad Tiolasa:

Hígado: Del mismo modo que la catalasa, son los fármacos del grupo AINEs los que producen un mayor incremento significativo respecto al control, si bien el probucol también produce un aumento significativo.

Cerebro: La administración de los cuatro fármacos produjo un aumento significativo respecto al control, aunque la varia-

ción producida por el diflunisal no fue significativa. El aumento más notable lo produjo el probucol.

3. Estudio del plasma

-Peroxidación lipídica (dienes conjugados): Hay un aumento significativo en todos los grupos tratados respecto al grupo control.

- Oligoelementos: Se produce un descenso significativo de zinc en el grupo de los hipolipemiantes. El hierro plasmático experimentó un aumento significativo en todos los grupos excepto en el del diflunisal.

- Metabolismo lipídico:

Colesterol: En el caso del colesterol el descenso es notorio para ambos hipolipemiantes y menor en el caso de los AINEs.

Triglicéridos: Se observa un aumento notable en el grupo del ácido acetilsalicílico y diflunisal, y ligero o nulo en los grupos de ambos hipolipemiantes.

HDL-colesterol: Respecto al HDL-c se observó un descenso en todos los grupos siendo el más característico el del clofibrato. El HDL-c en el caso del clofibrato representó el 68% del colesterol total, el mismo que para el probucol. Para el AAS fue el 67% y para el DIF fue el 65%. Todos estos porcentajes fueron inferiores que el del grupo control.

- Superóxido dismutasa: Se observa una disminución significativa de la actividad enzimática de la SOD en todos los grupos respecto al control.

4. Ácido ribonucleico

Hay un aumento de la expresión del mRNA del gen para la enzima acil-CoA oxidasa en algunas ratas tratadas con clofibrato. Esta sobreexpresión es menor con el probucol y el AAS.

Los resultados de las hibridaciones con el c-myc fueron en todos los casos negativos.

DISCUSIÓN

En el hígado los fármacos antiinflamatorios causaron un mayor incremento de la catalasa hepática que los agentes hipolipemiantes. Por el contrario en el cerebro la catalasa muestra diferentes característi-

cas siendo los más activos el probucol y clofibrato. Pensamos que ese fenómeno puede ser debido a la liposolubilidad y unión plasmática de las drogas, dos agentes limitantes en el cruce de la barrera hematoencefálica. Los AINEs se unen a proteínas en un 99%, de modo que la concentración de las drogas en el cerebro era menor que los agentes hipolipemiantes, los cuales se unen menos a proteínas y son más liposolubles.

Sorprendentemente el clofibrato, que es un estimulante de la proliferación peroxisómica, no provocó un incremento de la catalasa hepática. Estudios previos^{5,6} han basado el incremento de catalasa en el índice de proliferación peroxisómica, aunque existen estudios contrarios. Moody⁶ observó un descenso de la catalasa tras 28 días de tratamiento con clofibrato. Tras la administración de agentes estimulantes de la proliferación de peroxisomas, éste aumenta más que el contenido de catalasa. Según esto, la proliferación peroxisómica asociada a la hepatomegalia observada no se correlacionaba con el incremento de catalasa.

De la misma forma que la catalasa, son el acetilsalicílico y el diflunisal los que producen un mayor incremento hepático de la actividad tiolasa, mientras que en cerebro los fármacos hipolipemiantes son las más influyentes. Este cambio similar de la tiolasa y catalasa puede ser explicado de dos maneras. El primer mecanismo se basa en que la catalasa y la tiolasa se encuentran presentes en el peroxisoma y por tanto están expuestas de la misma forma a la acción de los fármacos. Otra posibilidad es que las drogas produjeran un incremento de la β -oxidación y un incremento del peróxido de hidrógeno, que no es eliminado debido a un descenso de catalasa. Este peróxido de hidrógeno produce una inhibición de la tiolasa. Los resultados de la expresión de mRNA acil-CoA oxidasa apoyan esta segunda hipótesis. Hay un incremento en ratas tratadas con clofibrato y menos en las tratadas con probucol y con acetilsalicílico. Teniendo en cuenta que la tiolasa y la acil-CoA oxidasa están en la misma vía metabólica, no podemos estar seguros que el mecanismo de inducción es

el mismo para ambos, dado que el clofibrato causa un incremento en la acil-CoA oxidada, pero no de la actividad tiolasa. Estos resultados nos permiten excluir la posibilidad de que las modificaciones enzimáticas vengan exclusivamente de la acción de los fármacos sobre las enzimas, sino más bien de una situación peroxidativa celular que modula directa e indirectamente la expresión de DNA.

Los resultados del presente estudio indican un aumento de la peroxidación lipídica en el plasma de las ratas tratadas con los cuatro fármacos. En contraste con estos resultados, Goel⁷ no encontró un incremento de los dienos conjugados en el hígado de ratas tratadas con ciprofibrato. Es importante señalar que la determinación de SOD, dienos conjugados, y elementos traza se han realizado en plasma, pero no en tejidos. Por tanto, es posible que los resultados en éstos no se correlacionen con lo encontrado en plasma y dependan de la concentración, acción o biodisponibilidad de los fármacos en ambos órganos.

Es interesante señalar las propiedades antioxidantes del probucol, que explicaría que su daño sea menor con menor formación de dienos conjugados y concentración de hierro y mayores niveles de zinc y SOD que el clofibrato.

Todas los fármacos excepto el diflunisal producen un incremento de los niveles de hierro que podrían ser dañinos debido a su participación en las reacciones de Fenton y Haber Weiss. Por otra parte, los niveles de zinc disminuyen en las ratas tratadas con hipolipemiantes, pero no con la administración de agentes antiinflamatorios. Estos resultados serían válidos si se considera que el zinc reduce los radicales libres por medio de su papel como coenzima en la SOD. No obstante, la concentración de cobre no se modificó, lo que podría indicar que el cobre tiene menor efecto en la formación de radicales libres. En este sentido, se sabe que el cobre tiene una doble acción; en primer lugar, participando como el hierro en la reacción de Fenton y Haber-Weiss, pero también con

acción protectora como coenzima de la SOD y ceruloplasmina.

El daño del oxígeno reactivo es prevenido por la catalasa, SOD, glutatión peroxidasa, etc. Cuando hay un exceso de radicales libres, las enzimas son insuficientes para frenar su proceso de propagación. Goel⁷ observó tras la administración de ciprofibrato un marcado descenso en la actividad de glutatión peroxidasa y transferasa hepática, responsable de la defensa frente al daño por peróxido de hidrógeno. Unos resultados parecidos los obtuvo Weglarz⁸ con ácido acetilsalicílico. Nosotros hemos encontrado un descenso significativo de actividad SOD. Todas las drogas parecen producir una situación de stress oxidativo que se muestra por un aumento de sustancias dañinas y descenso de moléculas protectoras.

CONCLUSIONES

1. Los fármacos ensayados no afectan a la ganancia ponderal, aunque sí al peso hepático (clofibrato) y al cerebral (AINEs).
2. El tratamiento durante quince días ha incrementado la actividad de las enzimas peroxisómicos catalasa, tiolasa y urato oxidasa no sólo modificando el estado peroxidativo celular o la actividad enzimática, sino también induciendo la expresión del gen de acil-CoA oxidasa.
3. El tratamiento con AINEs ha elevado las cifras de triglicéridos plasmáticos, en tanto que el clofibrato ha reducido los niveles de colesterol total y HDL-colesterol.
4. Tanto los hipolipemiantes como los AINEs incrementan el estado de peroxidación lipídica, con aumento de los dienos producidos y pérdida de actividad superóxido dismutasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. DE DUVE C *et al.* Intracellular localization of catalase and some oxidases in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1960; 40: 186-187.
2. SCHUTGENS R B H. Peroxisomal disorders: a newly recognised group of genetic diseases. *Eur J Pediatr* 1986; 144: 430-440.
3. HAJRA A, BURKE C, JONES C. Subcellular localization of acylcoenzyme A: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in rat liver

- peroxisomes. *J Biol Chem* 1979; 254: 10896-10900.
5. HESS R, STANBLI W, REISS W. Nature of hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutirate in rat. *Nature* 1965; 208: 856-858.
 5. KINDL H Y. Peroxisomes and glyoxisomes. *NY Acad Sci USA* 1982; 286.
 6. MOODY D E, REDDY J K. The hepatic effect of hypolipdemic drugs on hepatic peroxisomes and peroxisomes-associated enzymes. *Am J Pathol* 1978; 90: 435-450.
 7. GOEL S K, LALWANI N D, REDDY J K. Peroxisome proliferation and lipid peroxidation in rat liver. *Cancer Res* 1986; 46: 1324-1330.
 8. WEGLARZ L, DROZDZ M, GOSS M. Effect of antiinflammatory drugs on the activity of antioxidant enzymes and in vivo peroxidation products in the liver and kidney of rat. *Comp Biochem Physiol* 1990; 96: 83-85.