

# Implicación del receptor PPAR $\alpha$ en las alteraciones del metabolismo lipídico hepático en ratas viejas

E. Sanguino, M. Ramón y J.C. Laguna

Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

**Introducción-objetivos.** Los mecanismos causantes de las alteraciones que se producen con la edad en el metabolismo lipídico no se conocen en su totalidad. El objetivo de este trabajo ha sido determinar posibles alteraciones asociadas al envejecimiento en la expresión y actividad hepática de los factores PPAR $\alpha$  y SREBP-1 en rata macho y estudiar su implicación en los desórdenes lipídicos que se producen con el envejecimiento.

**Material y métodos.** Se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley de 3, 18 y 22 meses de edad. Se obtuvieron muestras plasmáticas para la determinación de valores lipídicos y hormonales, mediante distintos kits comerciales, y muestras de tejido hepático en las que se determinaron: valores relativos de ARNm para PPAR $\alpha$ , SREBP-1 y genes diana, mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa, proteína PPAR $\alpha$  y SREBP-1, mediante la técnica de Western-Blot y ensayos de retardación de la movilidad electroforética (EMSA), para estimar la actividad PPAR y SREBP-1.

**Resultados.** Las ratas macho de 18 y 22 meses presentaron en el ámbito hepático una marcada reducción en la expresión y en la actividad de unión PPAR $\alpha$ , sin que se modificara la actividad

NF $\kappa$ B. Esta reducción iba acompañada de una disminución en la expresión del ARNm de la carnitina-palmitoiltransferasa-I hepática (CPT-I) (64,6 y 56,2%;  $p < 0,01$ , para los grupos de 18 y 22 meses, respectivamente, frente a los valores del grupo de animales jóvenes), de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintasa mitocondrial (18 y 70% para los grupos de 18 y 22 meses, respectivamente, frente a los valores del grupo de animales de 3 meses) y de una acumulación hepática de triglicéridos. Se incrementó de forma moderada la expresión hepática y la actividad de unión del factor de transcripción SREBP-1 (proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1). Las ratas viejas eran hipercolesterolémicas e hipertrigliceridémicas, presentaban una menor concentración de ácidos grasos libres plasmáticos y valores elevados de insulina (3,4 y 1,9 veces para el grupo de 18 y 22 meses, respectivamente) y leptina (15,8 y 10,8 veces para los grupos de 18 y 22 meses, respectivamente). Los valores de ARNm de *ucp2* en hígado, gen cuya expresión está regulada por leptina, se vieron reducidos con la edad.

**Conclusiones.** Los resultados de este trabajo parecen indicar que la reducción en el ámbito hepático en la expresión y en la actividad de unión de PPAR $\alpha$  desempeña un papel muy importante en las alteraciones del metabolismo lipídico que aparecen con el envejecimiento y que probablemente estén asociadas a un marcado estado de resistencia a la leptina.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda económica proporcionada por FPCNL, CICYT (SAF00/0201), FISs (01/ 0075-01), BFI2002-05167, Generalitat de Catalunya (2001 SGR00141) y el premio SEA/Almirall Prodesfarma, convocatoria 2001.

Correspondencia: Dr. Juan C. Laguna.  
Unidad de Farmacología y Farmacognosia.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.  
Avda. Diagonal 643. 08028 Barcelona. España.  
Correo electrónico: laguna@farmacia.far.ub.es

**Palabras clave:**  
Triglicéridos. Leptina. L-CPT-I. HMG-CoA-sintasa mitocondrial. Ácidos grasos libres. PPAR $\alpha$ .

## IMPLICATION OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR $\alpha$ (PPAR- $\alpha$ ) IN ALTERATIONS OF HEPATIC LIPID METABOLISM IN ELDERLY RATS

**Introduction.** The mechanisms underlying alterations in lipid metabolism produced by aging are not completely understood. The aim of this study was to identify the possible changes produced by aging in liver expression and activity of nuclear factors PPAR- $\alpha$  and SREBP-1 in male rats, and their relationship with lipid disturbances produced by old age.

**Material and methods.** Male Sprague-Dawley rats 3, 18 and 22 month old were used. Plasma samples were obtained and concentrations of lipids and hormones were determined using commercial kits. Hepatic tissue samples were used for determination of mRNA relative levels for PPAR- $\alpha$ , SREBP-1 and target genes by RT-PCR, PPAR- $\alpha$  and SREBP-1 protein by Western-Blot, and PPAR and SREBP-1 binding activities by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

**Results.** The livers of 18- and 22-month old male Sprague-Dawley rats showed a marked decrease in PPAR- $\alpha$  expression and binding activity, with no changes in NF $\kappa$ B activity. Reductions were also found in mRNA expression of carnitine-palmitoyl transferase-I (L-CPT-I) (64.6 and 56.2%;  $p < 0.01$ , for the 18 and 22-month old groups, respectively, compared with values in the group of young rats), mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (mHMG-CoA synthase) (18 and 70% for 18- and 22-month-old rats, respectively, compared with values in the group of 3-monthold rats) and hepatic triglyceride accumulation. Liver expression and binding activity of the lipogenic transcription factor sterol response element binding protein-1 (SREBP-1) showed a modest increase. Elderly rats were hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic and had reduced concentrations of plasma fatty acids and high levels of plasma insulin (3.4 and 1.9-fold in the 18 and 22-month old groups, respectively) and leptin (15.8 and 10.8-fold in the 18 and 22-month old groups, respectively). The mRNA levels of the *ucp2* gene, which is under transcriptional control by leptin, were also reduced in liver tissue.

**Conclusions.** The results of this study suggest that decreased expression and binding activity of hepatic PPAR- $\alpha$  play a prominent role in the production of lipid metabolism disturbances in old age. These changes are probably related to a marked state of leptin resistance.

**Key words:**

Triglycerides. Leptin. L-CPT-1. Mitochondrial HMG-CoA synthase. Free fatty acids. PPAR- $\alpha$ .

## Introducción

El envejecimiento está asociado a inmunosenescencia, disminución de la secreción hormonal y del metabolismo hepático, pérdida de masa corporal y de masa ósea e incremento en la masa de tejido adiposo. Como consecuencia, con la edad aumenta la incidencia de una serie de desórdenes como son las enfermedades inflamatorias, las dislipemias, la aterosclerosis, la obesidad y la diabetes tipo 2<sup>1</sup>. Los mecanismos moleculares causantes de todos estos cambios fisiológicos en el organismo sólo se conocen parcialmente.

El sistema inmunitario de animales envejecidos presenta una elevada producción constitutiva de mediadores inflamatorios, como son las interleucinas IL-6 e IL-12, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la ciclooxigenasa-2. La hiperactivación espontánea del factor de transcripción regulado por estrés oxidativo NF $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) parece ser responsable de estos cambios<sup>2</sup>. Poynter et al<sup>3</sup> demostraron que el estado de hiperactivación del NF $\kappa$ B en esplenocitos obtenidos de ratones hembra viejos estaba relacionado con una disminución dependiente de la edad de la actividad del receptor nuclear PPAR $\alpha$  (receptor activado por proliferadores peroxisómicos  $\alpha$ ). La administración a ratones envejecidos de compuestos capaces de activar PPAR $\alpha$  fue capaz de eliminar la hiperactividad de NF $\kappa$ B y de reducir la producción espontánea de citocinas inflamatorias.

La subfamilia del receptor nuclear PPAR consiste en las isoformas  $\alpha$ , (NR1C1),  $\gamma$  (NR1C3), y  $\delta/\beta$  (NR1C2)<sup>4</sup>. La identificación de los genes diana de PPAR indica que PPAR $\alpha$  es el principal regulador de genes implicados en la oxidación lipídica, expresándose en células con elevada velocidad de catabolismo de ácidos grasos, como los hepatocitos. Por el contrario, PPAR $\gamma$  que se expresa fundamentalmente en el tejido adiposo, está implicado en el almacenamiento corporal de energía y es un factor clave en la diferenciación adipocitaria<sup>5,6</sup>.

Los mamíferos viejos, entre ellos el hombre, presentan un incremento en la concentración plasmática de lípidos<sup>7</sup> y una disminución en la oxidación de ácidos grasos. Esta disminución se debe principalmente a una menor capacidad oxidativa de los tejidos, más que a una reducción de la liberación de ácidos grasos, y es probablemente determinante

en el incremento de la concentración de lípidos plasmáticos y de grasa asociado a la edad<sup>8</sup>. Sin embargo, no se conocen, por el momento, los mecanismos causantes del deterioro en la oxidación de grasas asociado al envejecimiento.

Teniendo en cuenta los cambios ya mencionados en la expresión y actividad de PPAR $\alpha$  en células del sistema inmunitario de animales envejecidos, y el papel determinante de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en la homeostasis energética, nos hemos interesado en el estudio de la posible relación existente entre cambios en la actividad de los receptores PPAR y la alteración del metabolismo lipídico que se observa con el envejecimiento. Igualmente, hemos estudiado la expresión hepática en animales viejos de otro factor de transcripción, la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1 o SREBP-1, que controla la expresión de genes lipogénicos. Nuestros datos experimentales demuestran que las ratas viejas tienen una marcada reducción en la expresión hepática y la actividad de PPAR $\alpha$ . A partir de nuestros resultados y de otros recogidos en la bibliografía, hipotetizamos que la reducción hepática de PPAR $\alpha$  se encuentra relacionada con la marcada resistencia a la leptina que presentan los animales viejos.

## Material y métodos

### Animales

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Criffa, Barcelona). Los animales estuvieron estabulados durante una semana, con comida y agua *ad libitum* y con humedad y temperatura constantes, con un ciclo de 12 h de luz, 12 h de oscuridad. Tras este período de aclimatación los animales fueron pesados y sacrificados bajo anestesia con ketamina (100 mg/kg, i.p.) sobre las 9-10 a.m. En el momento del sacrificio se recogió una muestra de sangre en tubos con 5% EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), a partir de la cual se obtuvo el plasma por centrifugación y se guardó a -80 °C hasta el momento de las determinaciones. Se obtuvieron tres muestras de hígado. La primera (10-100 mg) se congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se guardó a -80 °C, para la posterior extracción de ARN total. Otra muestra hepática (500 mg) se guardó a -80 °C para la cuantificación de triglicéridos. Una última muestra de hígado de cada rata se utilizó, en fresco, para la obtención de extractos nucleares. Todos los procedimientos siguieron las directivas dadas por el Comité Bioético de la Universidad de Barcelona, según la Ley 5/1995 de la Generalitat de Catalunya.

### Metabolitos plasmáticos y hormonas

La glucosa, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma (NEFA) plasmáticos se determinaron en el Departamento de Bioquímica del Hospital Clínico de Barcelona, por procedimientos estandarizados. El resto de parámetros plasmáticos se determinaron por radioinmunoanálisis (RIA) usando los siguientes kits comerciales: KI 1523 de BioLink 2000 (Barcelona) para la hormona de crecimiento; RPA 547 y RPA 548 de Amersham Pharmacia Biotech (Barcelona) para la insulina y corticosterona, respectivamente, y RL83K de Clonagen (Madrid) para la leptina.

### Triglicéridos hepáticos

Los triglicéridos hepáticos se extrajeron y determinaron, siguiendo métodos descritos previamente<sup>9</sup>, con el kit 334-UV de Sigma (Madrid).

### Extracción y análisis del ARNm

El ARN total se aisló mediante el reactivo Ultraspec (Biotecx, Houston, USA). Los valores relativos de ARNm se determinaron a través de la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se sintetizó el ADN complementario a partir de 1  $\mu$ g de ARN total (menos en los casos de UCP-2 y SREBP-1, donde se utilizaron 0,5  $\mu$ g), mediante su incubación con 125 ng de hexámeros al azar (Promega), cebadores de la reacción, en presencia de tampón con 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de ditiotreitól, 200 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT, Invitrogen, Gaithersburg, USA), 20 U ARNsin (Invitrogen, Gaithersburg, USA) y 0,5 mM de cada dNTP (Sigma) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 h. Una alícuota de 5  $\mu$ l de la reacción de RT se utilizó para la reacción de amplificación de PCR que contenía en un volumen final de 50  $\mu$ l: 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia biotech), 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 0,5  $\mu$ g de cada oligonucleótido específico en presencia de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. Para evitar hibridaciones inespecíficas, la enzima y el producto de la RT se separaron de los oligonucleótidos específicos y dNTP mediante una capa de parafina que se funde cuando la reacción alcanza los 60 °C, dejando que los componentes entren en contacto. Las secuencias específicas de los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para la amplificación fueron: PPAR $\alpha$ , 5'-GGCTCGGAGGGCTCTGTCATC-3' y 5'-ACATGCACTGGCAGCAGTGGA-3'; L-CPT-I, 5'-TATGTGAGGATGCTGCTT-3' y 5'-CTCGGAGAGCTAAGCTTG-3'; UCP-2, 5'-AACAGTTCTACACCAAGGGC-3' y 5'-AGCATGGTAAGGGCACAGTG-3'; ACO, 5'-ACTATATTTGGCAATTTTGTG-3' y 5'-TGTTGGCAGTGGTTTCCAAGCC-3'; RXR $\alpha$ , 5'-GCTCTCCAACGGGTCGAGGCT-3' y 5'-TGGGTGTGGTGGGTACCGACA-3'; PPAR $\gamma$ , 5'-TGGGGATGCTCACAAATGCCA-3' y 5'-TTCCTGTCAAGATCGCCCTCG-3'; SREBP-1, 5'-TCACAGATCCAGCAGGTCCCC-3' y 5'-GGTCCCTCCA CTCACCAGGGT-3'; HMG-CoA-sintasa, 5'-CAGAGGCTGATGGAACGCACA-3' y 5'-GTTGGCAGCGTTGAAGAGGGA-3'; y APRT (adenosil-fosforibosil-transferasa), 5'-AGCTTCCCGGACTTCCC CATC-3' y 5'-GACCACTTTCTGCCCGGTTTC-3'. El gen *aprt* se ha utilizado como control interno de la reacción de PCR para normalizar los resultados, excepto en los casos de HMG-CoA-sintasa y PPAR $\gamma$ , en los que la coamplificación con *aprt* se realizó en tubos separados. La reacción de PCR se realizó en un termociclador MJ Research (Ecogen, Barcelona) y consta de las siguientes fases: a) desnaturalización a 94 °C durante 1 min; b) *n* ciclos de amplificación (18 para HMG-CoA-sintasa, 21 para APRT, 23 para ACO, CPT-I, PPAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  y SREBP-1 o 25 ciclos para PPAR $\gamma$ ); cada ciclo consistía en desnaturalización a 92 °C, 1 min, seguida de una hibridación con los oligonucleótidos específicos, a 60 °C (excepto para ACO, que fueron 58 °C), 1 min y 15 s y una etapa de síntesis a 72 °C 1 min 50 s, y c) etapa de síntesis final, a 72 °C 5 min. A partir de 5  $\mu$ l de reacción de PCR se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%, los productos de amplificación se visualizaron mediante la autorradiografía (radiografías Kodak X-ray) y se cuantificaron las bandas radiactivas por densitometría (Vilbert Lourmat Imaging). La amplificación de cada gen dio lugar a una única banda del tamaño esperado (PPAR $\alpha$ : 645 pares de bases (pb); PPAR $\gamma$ : 200 pb; CPT-I: 629 pb; UCP-2: 471 pb; ACO:

195 pb; RXR $\alpha$ : 202 pb; SREBP-1: 180 pb; HMG-CoA-sintasa: 204 bp; APRT: 329 pb). Se realizaron estudios preliminares sobre la cantidad de ADN a amplificar y el número de ciclos de amplificación para establecer las condiciones óptimas de trabajo para cada gen (por debajo del límite de saturación). En estas condiciones, esta técnica permite la cuantificación relativa del ARNm<sup>10</sup>. En todos los casos los resultados se expresan como los valores de cada uno de los genes estudiados normalizados con los del gen control (*aprt*).

### Obtención de extractos nucleares

Los extractos nucleares se aislaron siguiendo el método Dignam<sup>11</sup> con algunas modificaciones (Sonnenberg<sup>12</sup>). Brevemente, el tejido hepático, en fresco, se pesó y homogeneizó, con 4 volúmenes (p/v) de tampón A (0,25 M de sacarosa, 15 mM de Tris-HCl pH 7,9, 15 mM de NaCl, 60 mM de KCl, 1 mM de ácido etilen glicol-bis (aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), 5 mM de EDTA, 0,15 mM de espermina, 0,5 mM espermidina) y una mezcla de inhibidores de proteasas (0,1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil, 1,0 mM de ditiotreitol, 5  $\mu$ g/ml de aprotinina, 2  $\mu$ g/ml de leupeptina). Los homogenizados se incubaron durante 10 min en hielo y se centrifugaron a 2.000  $\times$  g, 10 min, 4 °C. Los pellets se resuspendieron en 4 volúmenes de tampón B (10 mM de N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[ácido2-etanosulfónico] (HEPES) pH 7,9, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl y los mismos inhibidores de proteasas anteriormente mencionados) y posteriormente se centrifugaron a 4.000  $\times$  g, 4 °C durante 10 min. Los pellets resultantes se resuspendieron en 2 volúmenes de tampón C (0,5 M de HEPES, pH 7,9, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M de KCl, 12,5% de glicerol y los inhibidores de proteasas) y ya homogeneizados se mantuvieron en agitación durante 30 min, a 4 °C. Se realizó una última centrifugación a 14.000  $\times$  g, durante 30 min., a 4 °C, y el sobrenadante resultante se dializó durante una noche a 4 °C con el tampón D (10 mM de Tris-HCl, pH 7,9, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 1,0 mM de EDTA, 10% glicerol y los inhibidores de proteasas). Finalmente, se recogieron los extractos nucleares obtenidos y se guardaron alicuotados a -80 °C. La concentración proteica de los extractos se determinó por el método Bradford<sup>13</sup>.

### Ensayos de Western blot

Los extractos nucleares hepáticos (40  $\mu$ g para determinar PPAR $\alpha$  y 80  $\mu$ g en el caso de SREBP-1) se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% y posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (ImmobilonTM-P, Millipore, Bedford MA, USA). La membrana se bloqueó 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 5% en Tris-Cl 25 mM, pH 8,3, NaCl 140 mM, KCl 2 mM y 0,05% de Tween 20 (NFDm TBS-T), se incubó con un anticuerpo anti-PPAR $\alpha$  (dilución 1:1000 en 5% NFDm TBS-T, suministrado por Dr. Wahli) durante una noche a 4 °C o anti SREBP-1 (dilución 1:200) (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:1.000 en 5% NFDm TBS-T, durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizó la detección mediante el kit ECL (Amersham). Las membranas también se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-actina (dilución 1:5.000 en 5% NFDm TBS-T, durante 1 h, temperatura ambiente) (Oncogen), utilizado como control de carga. El tamaño de las proteínas detectadas se estima gracias a los marcadores de peso molecular (Invitrogen).

### Ensayo de retardación de la movilidad electroforética (EMSA)

Las secuencias de los oligonucleótidos de doble cadena utilizadas fueron las siguientes: elemento de respuesta a PPAR *consensus*: 5'-CAAACTAGGTCAAAGGTCA-3' (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); oligonucleótido *consensus* del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' (Promega); y ABS (lugar de unión ADD1/SREBP-1), 5'-GATCCTGATCAGTGATCGAGGAG-3'<sup>15</sup>. Se marcaron radiativamente los oligonucleótidos mediante la siguiente reacción: 1  $\mu$ l del oligonucleótido (20 ng/ $\mu$ l), excepto en el caso de NF $\kappa$ B, que se utilizaron 2  $\mu$ l (1,75 pmol/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l del tampón kinasa 5x, 5 U del enzima T4 polinucleótido cinasa (10 U para NF $\kappa$ B), y 3  $\mu$ l de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3.000 C/mmol a 10 mC/ml, Amersham), incubado a 37 °C durante 1 h. Se paró la reacción añadiendo 90  $\mu$ l del tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y EDTA-1 mM). Para separar la sonda marcada del ATP no unido, se eluyó la mezcla de reacción en una columna Nick (Farmacia, Sant Cugat, España) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubaron 4  $\mu$ g de extracto nuclear (8  $\mu$ g para el EMSA de ABS) con el tampón de unión (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 25 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, glicerol 5%, BSA 5 mg/ml, tARN 100  $\mu$ g/ml y poly(dI-dC) 50  $\mu$ g/ml), en un volumen final de 15  $\mu$ l, durante 10 min en hielo. Se añadió la sonda marcada (aproximadamente 50.000 cpm) y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 20 min. En los ensayos de competición, se incubó durante 15 min a 4 °C con el oligonucleótido específico no marcado, antes de añadir la sonda marcada radiativamente. De la misma manera, en los ensayos de super-retardación se incubó con los anticuerpos específicos durante 30 min a 4 °C, antes de incubar con la sonda marcada. Los complejos proteína-ADN se sometieron a electroforesis a 4 °C en un gel al 5% de acrilamida y posteriormente se realizó la autorradiografía. Los anticuerpos contra PPAR $\alpha$  y Oct-1 (factor de transcripción octamérico para motivo-1) e IgG inespecíficas de conejo se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology.

### Estadística

Los resultados son la media  $\pm$  DE de 3-5 experimentos. Las muestras de plasma se ensayaron por duplicado. Las diferencias significativas se establecieron por un test de ANOVA, a través del programa informático GraphPad-InStat-tm (GraphPad Software V2.03). En caso de varianzas no homogéneas se aplicaba un test no-paramétrico (test Kruskal-Wallis). Las variaciones significativas se analizaron por el test de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

### Resultados

No se observó un incremento del peso medio de los machos de 22 meses respecto a los de 18, pero sí hubo un aumento significativo, de 300 g, del peso del grupo de 18 meses respecto a los animales jóvenes ( $387 \pm 25$ ,  $678 \pm 75$  y  $679 \pm 85$  g de peso corporal para las ratas macho de 3, 18, y 22 meses, respectivamente). Este incremento de peso se debió mayoritariamente a un incremento en la grasa visceral ( $2,6 \pm 0,2$  frente a  $6,9 \pm 2,4$  g y  $6,2 \pm 1,9$  g de grasa epididimal para 3, 18 y 22 meses, respectivamente,  $p < 0,01$ ).

La concentración de metabolitos y hormonas plasmáticas para los diferentes grupos de anima-

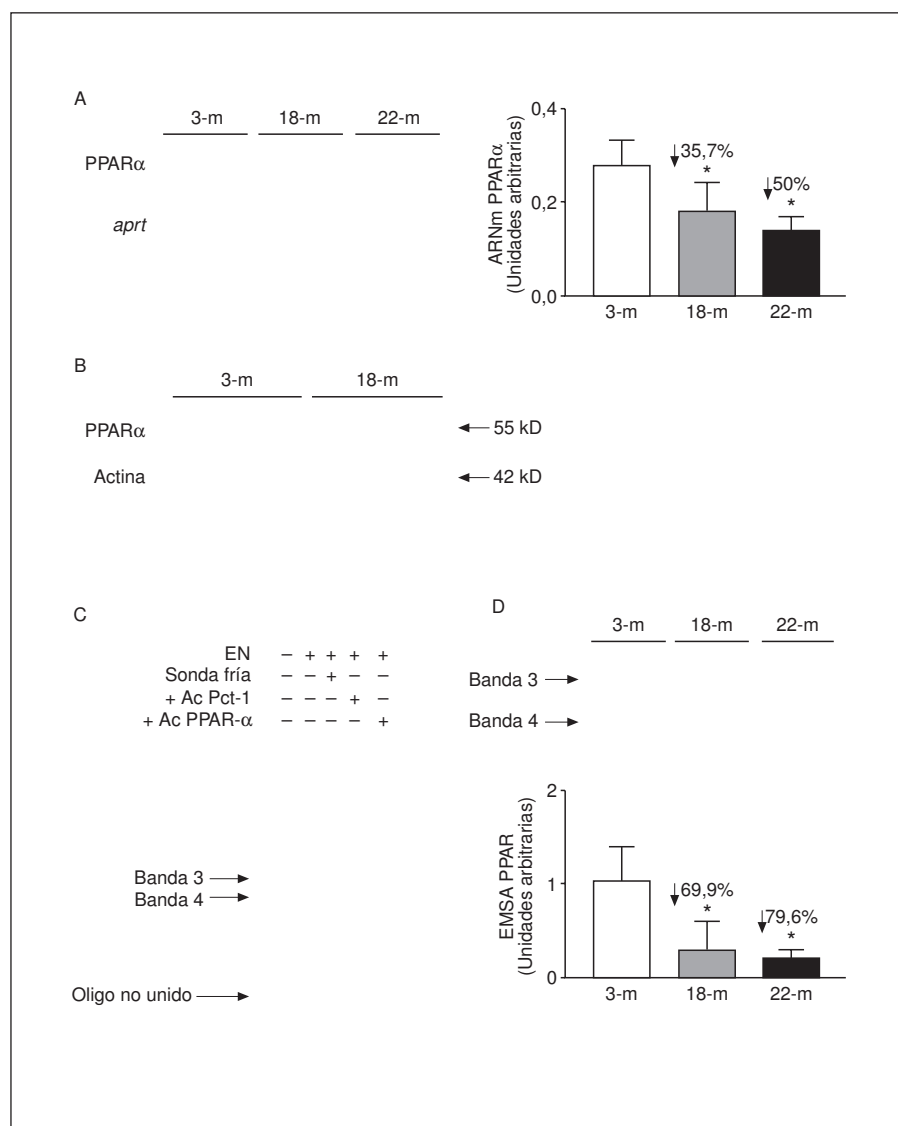
**Tabla 1. Concentración plasmática de metabolitos y hormonas de ratas macho de 3, 18 y 22 meses de edad. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  DE de 8-10 animales por grupo**

	3 meses	18 meses	22 meses
Colesterol (mg/dl)	74,7 $\pm$ 9,8	143,8 $\pm$ 56,4*	136,6 $\pm$ 30,5*
Triglicéridos (mg/dl)	147,7 $\pm$ 65,2	201,0 $\pm$ 52,9**	181,5 $\pm$ 52,6
AGL (mmol/l)	258,3 $\pm$ 180,4	112,6 $\pm$ 74,1**	158,9 $\pm$ 97,5
Glucosa (mg/dl)	174,8 $\pm$ 23,6	171,6 $\pm$ 22,4	161,5 $\pm$ 15,8
Insulina (ng/ml)	2,42 $\pm$ 1,04	8,23 $\pm$ 5,78*	4,67 $\pm$ 2,93**
Leptina (ng/ml)	1,37 $\pm$ 1,10	22,21 $\pm$ 8,8*	15,14 $\pm$ 10,7*
Corticosterona (ng/ml)	7,71 $\pm$ 8,45	6,67 $\pm$ 5,85	8,78 $\pm$ 6,41
Hormona de crecimiento (ng/ml)	11,14 $\pm$ 1,94	5,08 $\pm$ 3,81*	4,27 $\pm$ 2,61*

\*p < 0,01; \*\*p < 0,05 frente a los valores de 3 meses. AGL: ácidos grasos libres.

les se muestra en la tabla 1. Las ratas viejas eran hipercolesterolémicas y moderadamente hipertriglicéridémicas respecto a los animales de 3 meses. Los valores de NEFA disminuyeron con la edad

(56% a los 18 meses y 38% a los 22 meses respecto a los valores de las ratas jóvenes). Aunque las ratas viejas eran normoglucémicas, presentaban una clara hiperinsulinemia (3,4 y 1,9 veces los va-



**Figura 1.** A) Valores relativos de ARNm de PPAR $\alpha$  en muestras hepáticas de ratas de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 (22-m) meses (5 animales por grupo). A la izquierda de la figura se presenta una autorradiografía representativa que muestra las bandas correspondientes al ARNm de PPAR $\alpha$  y del gen *aprt*, utilizado como control interno en la reacción de PCR para normalizar los resultados. B) Western blot de PPAR $\alpha$  en muestras hepáticas de animales de 3 (3-m) y 18 meses (18-m); se utilizó la actina como control de carga de cantidades iguales de proteína. C) EMSA que muestra la participación del PPAR $\alpha$  endógeno de extractos nucleares hepáticos de ratas de 3 meses en la formación de las bandas 3 y 4, ya que desaparecen en presencia de un anticuerpo PPAR $\alpha$  (Ac). El anticuerpo Oct-1 se utilizó para demostrar que la desaparición de las bandas 3 y 4 no fue debida a interferencias inespecíficas producidas por la presencia en el medio de incubación de inmunoglobulinas. D) Cuantificación de la intensidad de las bandas 3 y 4 del EMSA realizado con extractos nucleares hepáticos de animales de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (se ensayaron 4 extractos nucleares por grupo y cada extracto estaba constituido por un *pool* de cantidades iguales de tejido hepático de dos animales diferentes). En la parte superior de la figura se presenta una autorradiografía representativa de la bandas 3 y 4 del ensayo de EMSA. \*p < 0,01.

lores de insulina de los animales jóvenes, a los 18 y 22 meses, respectivamente). Además, los animales viejos presentaron una concentración de leptina plasmática mucho mayor que los jóvenes (15,8 y 10,8 veces a 18 y 22 meses, respectivamente, respecto a los valores de los machos de 3 meses). Los valores de corticosterona plasmática no variaron en los grupos de animales viejos, mientras que se observó un descenso de la hormona de crecimiento del 54 y 61% a los 18 y 22 meses, respectivamente, con respecto a los valores de las ratas de 3 meses.

En el ámbito hepático se detectó un descenso en la cantidad relativa de ARNm y en la cantidad de proteína de PPAR $\alpha$  (fig. 1A y 1B). En el EMSA realizado con un oligonucleótido PPRE (elemento de respuesta a los proliferadores peroxisómicos), la competición con sonda no marcada y la disminución de unión al coincubar con anticuerpo anti-PPAR $\alpha$  ponen de manifiesto la participación del PPAR $\alpha$  endógeno de los extractos nucleares hepáticos en la formación de las bandas 3 y 4 (fig. 1C). La banda 3, en concreto, disminuyó un 70 y 80% en el EMSA realizado con los extractos nucleares de los animales de 18 y 22 meses, respectivamente (fig. 2D), frente a los valores de los animales jóvenes. No hubo incremento en la actividad de unión NF $\kappa$ B (fig. 2) en los grupos de animales viejos, lo que indica que el descenso en el ARNm y la actividad PPAR $\alpha$  hepática no se debió a una hiperactivación del NF $\kappa$ B, como se había descrito en otros tejidos<sup>3</sup>.

Los valores de ARNm para L-CPT-I (carnitina-palmitoil-transferasa I hepática) y HMG-CoA-sintasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintasa) mitocondrial, genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y en la síntesis de cuerpos cetónicos, respectivamente, ambos regulados por PPAR $\alpha$ , disminuyeron significativamente con la edad (56,2 y 70%, respectivamente, en las muestras hepáticas de las ratas de 22 meses comparadas con los valores de las de 3 meses) (fig. 3A y 3B). Sin embargo, la expresión de la ACO (acil-CoA oxidasa) no se vio modificada ( $1,56 \pm 0,32$ ,  $1,54 \pm 0,15$  y  $1,31 \pm 0,12$  unidades arbitrarias de ARNm, para animales de 3, 18 y 22 meses, respectivamente). Estos cambios se vieron acompañados por un acusado incremento en el contenido hepático de triglicéridos (2,6 y 2,7 veces a los 18 y 22 meses, respectivamente, respecto al valor de los animales jóvenes) (fig. 3C).

Un incremento en la síntesis hepática de lípidos podría contribuir también a la acumulación de triglicéridos en el hígado; por ello estudiamos el factor SREBP-1, que controla la expresión de genes que codifican para enzimas lipogénicos. Sin em-

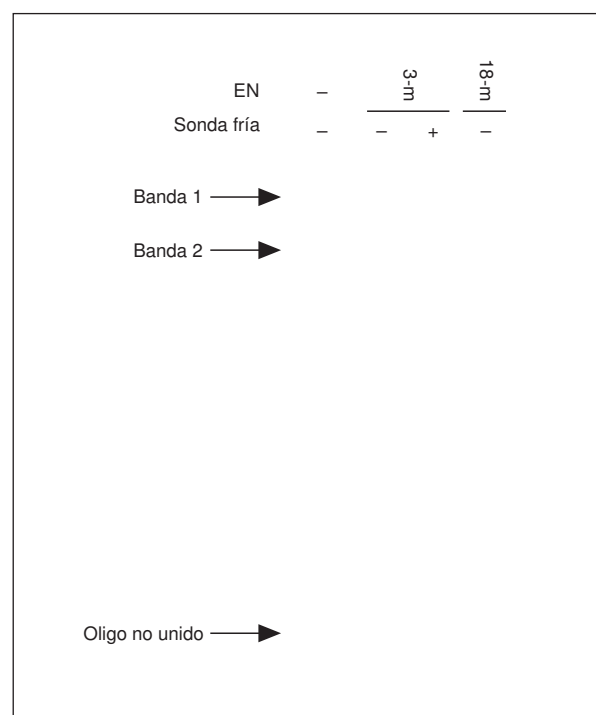


Figura 2. EMSA que muestra la unión de extractos nucleares (EN) hepáticos obtenidos de ratas jóvenes (3 meses, 3-m) y viejas (18 meses, 18-m) al oligonucleótido consenso del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B).

bargo, sólo se detectó un ligero incremento en los valores de ARNm (fig. 4A) y en la cantidad de proteína madura (fig. 4B) de SREBP-1 en los animales viejos con respecto a los jóvenes. Aunque el patrón de bandas del EMSA variaba ostensiblemente en los extractos nucleares obtenidos de animales viejos, respecto al presentado por los animales jóvenes, no pudimos obtener una retardación significativa de ninguna de las bandas en presencia de anticuerpo anti-SREBP-1 (no se muestran los resultados).

La expresión hepática de PPAR $\gamma$  ( $1,9 \pm 0,8$ ,  $1,3 \pm 0,3$  y  $1,4 \pm 0,5$  unidades arbitrarias de ARNm, para 3, 18 y 22 meses, respectivamente), y la del factor de heterodimerización de los PPARs, el RXR $\alpha$  (receptor al ácido 9-*cis* retinoico) ( $3,9 \pm 0,7$ ,  $4,5 \pm 0,7$  y  $4,4 \pm 1,4$  unidades arbitrarias de ARNm para 3, 18 y 22 meses, respectivamente), no se modificaron con la edad.

Finalmente, determinamos los valores de ARNm de *ucp-2* (proteína de desacoplamiento-2), gen cuya proteína está implicada en procesos de disipación de energía<sup>16</sup>, y se comprobó que la expresión de UCP-2 estaba significativamente reducida en el tejido hepático de los animales viejos con respecto a los jóvenes (fig. 5).

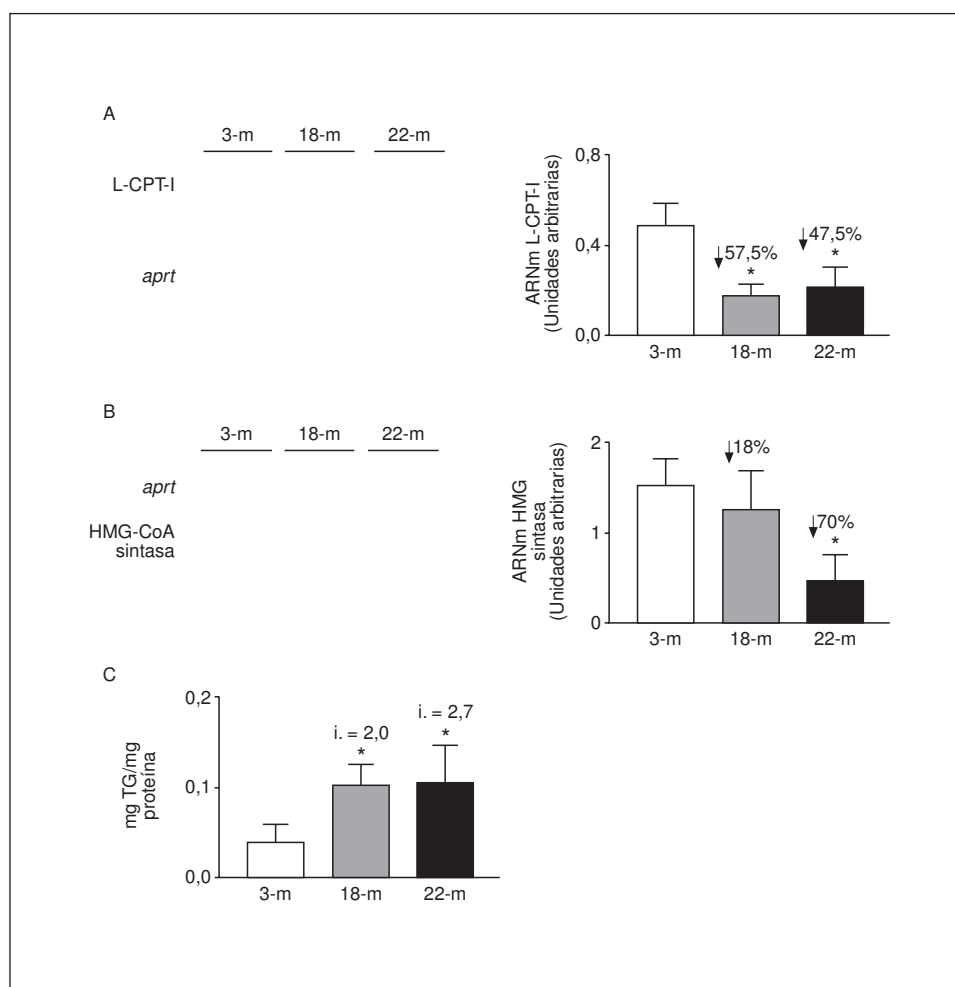


Figura 3. A) Valores relativos de ARNm de L-CPT-I en muestras hepáticas de los animales de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (5 animales por grupo). A la izquierda de la figura se presenta una autorradiografía representativa que muestra las bandas correspondientes al ARNm de L-CPT-I y del gen control *aprt*, utilizado como control interno en la reacción de PCR para normalizar los resultados. B) Valores relativos de ARNm de HMG-CoA-sintasa en muestras hepáticas de animales de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (5 animales por grupo). Se presenta una autorradiografía del ensayo y se muestran las bandas correspondientes al ARNm de HMG-CoA-sintasa y los del del gen control *aprt*. C) Contenido de triglicéridos hepáticos, expresado en miligramos de triglicérido por miligramos de proteína, de los animales de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (8 animales por grupo). \* $p < 0,01$ .

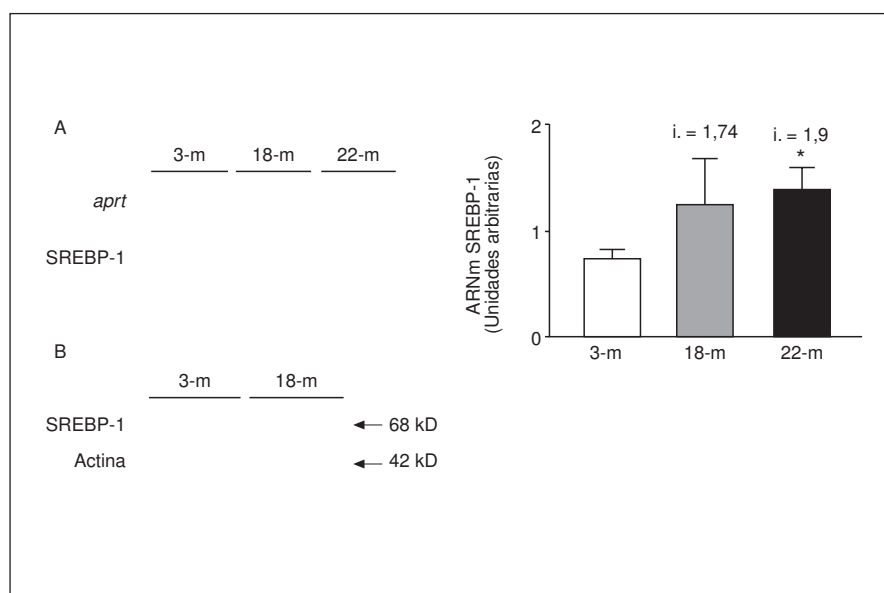
## Discusión

En nuestras condiciones experimentales, los cambios más relevantes en los parámetros lipídicos asociados al envejecimiento fueron un incremento en la acumulación hepática de triglicéridos, junto a una marcada hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y una reducción significativa de los NEFA. Estos cambios se vieron acompañados de una clara reducción de la expresión y la actividad de unión PPAR $\alpha$  en el ámbito hepático. Aunque existen trabajos anteriores<sup>2</sup> que asocian los cambios en la expresión y actividad de PPAR $\alpha$  con la edad a una hiperactivación de la transcripción del factor NF $\kappa$ B, en este estudio la actividad de unión NF $\kappa$ B en el hígado no se vio modificada con la edad.

La acumulación hepática de triglicéridos con la edad está probablemente relacionada con la disminución de la actividad PPAR $\alpha$ . La ausencia de expresión PPAR $\alpha$  en ratones PPAR $\alpha$ -deficientes<sup>17</sup> o la inhibición de la actividad transcripcional PPAR $\alpha$ <sup>18</sup> se

asocia a acumulación de triglicéridos en el hígado, que puede ser debida, en parte, a una disminución en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos<sup>17</sup>. De hecho, los hígados de las ratas macho envejecidas presentan una marcada reducción de los valores de ARNm para L-CPT-I y de mHMG-CoA-sintasa. La expresión de los genes *cpt-I* y *mhm-coa-sintasa* están bajo control transcripcional de PPAR $\alpha$ , y la actividad de las enzimas que codifican regula la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y la síntesis de cuerpos cetónicos, respectivamente<sup>19</sup>. Aunque *aco* es otro gen relacionado directamente con la oxidación peroxisómica de ácidos grasos y tiene un elemento de respuesta a PPAR en su región promotora, su expresión basal no está regulada<sup>20</sup> por PPAR $\alpha$ , lo cual explicaría el hecho de que no se modifiquen los valores de ARNm para ACO con el envejecimiento, a pesar de que disminuya claramente la actividad PPAR $\alpha$ . Recientemente, Panadero et al<sup>21</sup> han descrito un comportamiento similar en ratas lactantes.

Figura 4. A. Valores relativos de ARNm de SREBP-1 en muestras hepáticas de ratas de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (4 animales por grupo). A la izquierda de la figura se presenta una autorradiografía representativa que muestra las bandas correspondientes al ARNm de SREBP-1 y del gen control *aprt*. \* $p < 0,05$ . B) Western blot de SREBP-1 en muestras hepáticas de animales de 3 (3-m) y 18 meses (18-m); se utilizó la actina como control de carga de cantidades iguales de proteína.

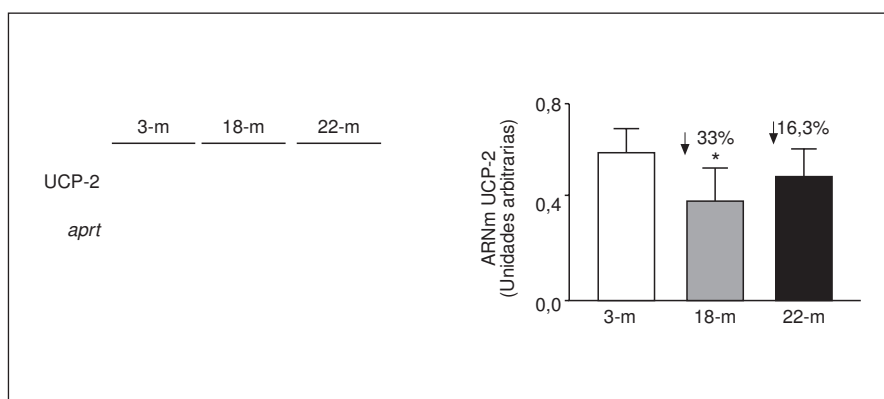


La expresión y/o la actividad PPAR $\alpha$  está regulada por varios sistemas hormonales, se incrementa por corticoides y leptina, y disminuye por hormona de crecimiento e insulina<sup>14,21-24</sup>. El hecho de que las ratas viejas no presentaran cambios en las concentraciones de corticosterona plasmática y tuvieran menores valores plasmáticos de hormona de crecimiento parece indicar que estas hormonas no están implicadas en la reducción hepática de la expresión de PPAR $\alpha$ . Aunque las ratas viejas eran hiperinsulínicas, sus valores de glucosa en plasma eran normales, lo que indicaría que los elevados valores de insulina eran suficientes para mantener una respuesta normal a la insulina en los tejidos. Además, las ratas viejas presentaron hiperleptinemia. Se ha demostrado recientemente<sup>24</sup> que las ratas viejas son resistentes a la actividad de la leptina y que en ausencia de actividad de leptina, se incrementa la lipogénesis y se reduce la oxidación de ácidos grasos

mediada por PPAR $\alpha$ , causando la esteatosis y lipotoxicidad propia de estas situaciones<sup>25,26</sup>. Por todo esto, la marcada reducción de la expresión hepática de PPAR $\alpha$  con el envejecimiento se debe probablemente a una estado de resistencia a la actividad de la leptina en este tejido. Apoyando esta hipótesis, los valores de ARNm para *ucp-2*, gen cuya expresión se incrementa con la actividad de la leptina<sup>27</sup>, disminuyeron de forma significativa en el hígado de los animales viejos con respecto a los jóvenes.

La deficiencia en PPAR $\alpha$  también está relacionada con el incremento en el colesterol y los triglicéridos plasmáticos y con las concentraciones de NEFA<sup>28,29</sup>. Aunque los machos viejos presentaron hipercolesterolemia e hiperleptinemia, mostraron unas concentraciones de NEFA claramente disminuidas frente a los valores de los animales jóvenes. Sin embargo, las ratas viejas presentaron un incremento en el tejido adiposo blanco, fenó-

Figura 5. Valores relativos de ARNm de UCP-2 en muestras hepáticas de ratas de 3 (3-m), 18 (18-m) y 22 meses (22-m) (5 animales por grupo). A la izquierda de la figura se presenta una autorradiografía representativa que muestra las bandas correspondientes al ARNm de UCP-2 y del gen control *aprt*. \* $p < 0,05$ .



meno claramente establecido en el proceso de senescencia en roedores<sup>1,24,30</sup>. Dado que también se ha demostrado que deficiencias en la actividad de la leptina causan hipertrofia adipocitaria<sup>24,31</sup>, se podría deducir que en nuestros animales envejecidos probablemente se esté produciendo un incremento del flujo y acumulación de ácidos grasos libres hacia el tejido adiposo blanco, lo cual explicaría la disminución en los NEFA plasmáticos y el aumento del tejido adiposo observado en estos animales.

En conclusión, nuestros resultados parecen indicar que en ratas macho viejas las alteraciones en la homeostasis lipídica en el ámbito hepático son debidas a una marcada reducción de la expresión y actividad de PPAR $\alpha$ , y que estos cambios están probablemente relacionados con una resistencia a la actividad de la leptina y no con una hiperactivación del factor de transcripción NF $\kappa$ B.

## Bibliografía

- Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 2001;35:1-62.
- Spencer NFL, Poynter ME, Suhm-Young I, Daynes RA. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B in an animal model of aging. *Int Immunol* 1997;9:1581-8.
- Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation modulates cellular redox status, represses Nuclear Factor- $\kappa$ B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 1998;273:32833-41.
- Neve BP, Fruchart J-C, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1245-50.
- Braissant O, Foulle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR $\alpha$ - $\beta$  y - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.
- Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mut Res* 2000;448:121-38.
- Parini P, Angelin B, Rudling M. Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:832-9.
- Toth MJ, Tchernof A. Lipid metabolism in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:S121-5.
- Verd JC, Peris C, Alegret M, Díaz C, Hernández G, Vázquez M, et al. Different effect of simvastatin and atorvastatin on key enzymes involved in VLDL synthesis and catabolism in high fat/cholesterol fed rabbits. *Br J Pharmacol* 1999;127:1479-85.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana EV. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Bio Techniques* 1999;26:112-25.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid Res* 1983;11:1475-89.
- Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JJ. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 1989;3:359-65.
- Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Lemberger T, Saladin R, Vázquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 1996;271:1764-9.
- Kim JB, Spotts GD, Halvorsen Y, Shih H, Ellenberger T, Towle HC, et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* 1995;15:2582-8.
- Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, Candelore MR, Doebber TW, Ventre J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  y  $\alpha$  mediate *in vivo* regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 1998;139:4920-7.
- Akiyama TE, Nicol CJ, Fieve C, Staels B, Ward JM, Auwerx J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity. Studies with congenic mouse lines. *J Biol Chem* 2001;276:39088-93.
- Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 2001;276:68-75.
- Louet J-F, Le May C, Pégrier J-P, Decaux J-F, Girard J. Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans* 2001;29:310-6.
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, et al. Targeted disruption of the  $\alpha$  isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995;15:3012-22.
- Panadero M, Vidal H, Herrera E, Bocos C. Nutritionally induced changes in the peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  gene expression in liver of suckling rats are dependent on insulinemia. *Arch Biochem Biophys* 2001;394:182-8.
- Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  gene by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1994;269:24527-30.
- Carlsson L, Lindén D, Jalouli M, Oscarsson J. Effects of fatty acids and growth hormone on liver fatty acid binding protein and PPAR $\alpha$  in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E772-81.
- Wang Z-W, Pan W-T, Lee Y, Kakuma T, Zhou Y-T, Unger RH. The role of leptin in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J* 2001;15:108-14.
- Lee Y, Hirose H, Zhou Y-T, Esser V, McGarry JD, Unger RH. Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 1997;46:408-13.
- Lee Y, Wang M-Y, Kakuma T, Wang Z-W, Babcock E, McCorkle K, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem* 2001;276:5629-35.
- Zhou Y-T, Wang Z-W, Higa M, Newgard CB, Unger RH. Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2391-5.
- Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, González FJ, et al. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -deficient mice. *J Biol Chem* 1997;272:28307-12.
- Tordjman K, Bernal-Mizrahi C, Zeman L, Weng S, Feng C, Zhang F, et al. PPAR $\alpha$  deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* 2001;107:1025-34.
- Mooradian AD, Hurd R, Chehade J, Pun K, Haas MJ. Age-related changes in plasma leptin binding activity in rats: a comparison of a simple acid-ethanol precipitation technique with column chromatography. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224:273-7.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeida K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) deficiency and PPAR $\gamma$  agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001;276:41245-54.