

Los fibratos modifican la expresión hepática de colesterol 7- α -hidroxilasa, MDR3 y ABCG5 en pacientes con colelitiasis

N. Roglans^a, F. Novell^b, D. Zambón^c, E. Ros^c, J.C. Laguna^a y R.M. Sánchez^a

^aUnidad de Farmacología y Farmacognosia. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona.

^bDepartamento de Cirugía. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

^cClínica de Lípidos. Servicio de Nutrición y Dietética. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

Introducción. El tratamiento con fibratos provoca cambios tanto en el contenido de lípidos biliares como en la composición de los ácidos biliares, lo que conduce a un incremento de la incidencia de colelitiasis en humanos. Los mecanismos moleculares implicados en estos cambios, observados en pacientes tratados con fibratos durante un largo período, todavía no han sido descritos. El objetivo de este estudio ha sido investigar el efecto del tratamiento con fibratos en los factores clave implicados en la síntesis de ácidos biliares y en la secreción biliar de lípidos en pacientes con colelitiasis.

Pacientes y método. Pacientes con colelitiasis y valores de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) elevados (> 130 mg/dl) fueron aleatorizados y asignados al tratamiento con bezafibrato (400 mg/día), fenofibrato (200 mg/día), gemfibrozilo (900 mg/día) o placebo, durante 8 semanas antes de proceder a la intervención quirúrgica (colecistectomía electiva). La obtención de muestras hepáticas tuvo lugar en el momento de la operación y mediante RT-PCR se determinaron los valores de ARNm de colesterol 7- α -hidroxilasa (CYP7A1), *hepatocyte nuclear factor-4* (HNF-4), transportadores ATP-binding cassette: MDR3, ABCG5, ABCG8 y el homólogo humano del receptor *scavenger BI* (CLA-1).

Correspondencia: Núria Roglans Ribas.
Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: roglans@ub.edu

Recibido el 8 de septiembre de 2003 y aceptado el 27 de febrero de 2004.

Resultados. Fenofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo redujeron de forma significativa los valores de cLDL y triglicéridos plasmáticos. Los 3 fibratos ensayados redujeron los valores de ARNm de CYP7A1, pero sólo el bezafibrato incrementó significativamente los valores de ABCG5. Ninguno de los fármacos por separado produjo cambios importantes en los valores de ARNm de los restantes genes probados, pero los fibratos como grupo incrementaron el ARNm de MDR-3 y ABCG5.

Conclusiones. Estos resultados muestran por primera vez que la administración de fibratos a humanos, a dosis similares a las farmacológicas, reduce la expresión de la colesterol 7- α -hidroxilasa e incrementan la expresión de MDR-3 y ABCG5.

Palabras clave:
Excreción de lípidos biliares. CYP7A1. HNF-4. MDR3. CLA-1. ABCG5. ABCG8.

FIBRATES MODIFY THE HEPATIC EXPRESSION OF CHOLESTEROL 7- α -HYDROXYLASE, MDR3 AND ABCG5 IN PATIENTS WITH COLELITHIASIS

Introduction. Fibrate therapy induces adverse changes in biliary lipid and bile acid composition, which leads to an increased incidence of cholesterol gallstones. The molecular mechanisms underlying these changes on long-term therapy with fibrates are still unclear. The aim of this study was to investigate the effect of fibrate treatment on key factors involved on bile acid synthesis and biliary lipid secretion in gallstone patients.

Patients and method. Patients with uncomplicated cholelithiasis and a serum LDL

cholesterol concentration > 130 mg/dL were randomly assigned to open-label treatment with bezafibrate (400 mg/day), fenofibrate (200 mg/day), gemfibrozil (900 mg/day) or placebo for 8 weeks before elective cholecystectomy. A liver specimen was obtained during surgery, and the mRNA relative levels for cholesterol 7- α -hydroxylase (CYP7A1), hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4), ATP-binding cassette transporters: MDR3, ABCG5, ABCG8, human homologue scavenger receptor BI, were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Results. Fenofibrate, bezafibrate and gemfibrozil significantly reduced plasma LDL cholesterol and triglycerides. The 3 fibrates tested reduced CYP7A1 mRNA levels, but only bezafibrate significantly increased ABCG5 mRNA. None of the fibrates induced significant changes in the mRNA levels of the remaining genes tested, but fibrates, as a group, increased MDR-3 and ABCG5 mRNA.

Conclusions. These results show for the first time that fibrate administration to humans, at pharmacological doses that induce a hypolipidemic effect, down-regulates CYP7A1 and increases the mRNA levels of MDR3 and ABCG5.

Key words:

Biliary lipid secretion. CYP7A1. HNF-4. MDR3. CLA-1. ABCG5. ABCG8.

Introducción

Los fibratos son fármacos hipolipemiantes capaces de modificar la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico mediante la activación del receptor activado por proliferadores peroxisómicos o PPAR¹.

El tratamiento con fibratos incrementa la concentración biliar de colesterol y fosfolípidos, mientras que reduce los valores de ácidos biliares. Estos cambios pueden llegar a saturar de colesterol la bilis e incrementar la incidencia de aparición de cálculos biliares en pacientes tratados de manera crónica con estos fármacos²⁻⁴. La aparición de cálculos biliares o colelitiasis ha sido estrechamente relacionada con la reducción de la actividad hepática de la enzima colesterol 7- α -hidroxilasa provocada por la administración de fibratos^{5,6}. Sin embargo, se conocen muy poco los efectos de estos fármacos en la expresión de esta enzima y otros factores implicados en la secreción de lípidos biliares en el hombre.

La colesterol 7- α -hidroxilasa (CYP7A1) es una enzima que cataliza el primer eslabón de la cadena de síntesis de ácidos biliares hepáticos^{7,8}. Los áci-

dos biliares también se pueden sintetizar mediante una ruta sintética alternativa (*alternative/acidic pathway*) que en humanos produce sólo el 10% del total de ácidos biliares generados⁹. La expresión de la CYP7A1 se encuentra regulada a nivel transcripcional por una variedad de hormonas y factores nutricionales^{10,11}. El papel del receptor PPAR α en el control de la síntesis de ácidos biliares y de su composición no está del todo claro. Mientras los activadores de PPAR α inducen la expresión del receptor LXR α ¹², regulador positivo de la expresión de CYP7A1¹³, los fibratos disminuyen la actividad de esta enzima en roedores^{5,14} y humanos⁴.

Por otra parte, la regulación de la síntesis y del metabolismo del colesterol tiene lugar a nivel transcripcional. CLA-1 (receptor *scavenger* humano homólogo al receptor *scavenger* clase B tipo I o SR-BI) y ABC (familia de *ATP-binding cassette transporters*) desempeñan un papel muy importante en la homeostasis del colesterol. Se conoce que CLA-1/SR-BI está implicado en el transporte inverso de colesterol y se postula que podría modular también su excreción biliar¹⁵⁻¹⁸. Además, se ha sugerido que 2 miembros de la familia de transportadores ABC, denominados ABCG5 y ABCG8, pueden estar implicados en el flujo de esteróles ingeridos en la dieta desde las células epiteliales del intestino hasta la luz del intestino y desde el hígado hacia el conducto biliar¹⁹. MDR-3, otro miembro de la familia de transportadores ABC, facilita el paso de fosfatidilcolina hacia la bilis a través del espacio canalicular mediante la formación de micelas con colesterol y ácidos biliares²⁰. Los efectos del tratamiento con fibratos sobre CLA-1 o ABC en humanos no se conocen; sin embargo, se sabe que los fibratos inducen la expresión de CLA-1 y *mdr-2* (gen homólogo al MDR-3 en roedores) en macrófagos humanos y en roedores, respectivamente²¹⁻²³.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar los efectos del tratamiento con fibratos sobre la expresión de factores clave implicados en la secreción biliar de lípidos y en la síntesis de ácidos biliares en pacientes con un cuadro moderado de hiperlipemia y que estaban pendientes de una colecistectomía.

Pacientes y método

Pacientes

Los 28 pacientes utilizados en este trabajo (7 varones y 21 mujeres de 60 ± 7 años de edad) formaban parte de un estudio clínico más amplio, cuyo objetivo era determinar los efectos de los fibratos en los diferentes genes diana del receptor PPAR α ²⁴. Los participantes estaban programados para una colecistectomía y tanto la intervención quirúrgica como el seguimiento

miento fue realizado en el Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Estos pacientes no presentaban indicios de enfermedad hepática ni obstrucción biliar. Los valores de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) de estos pacientes eran $> 3,36$ mmol/l (130 mg/dl) y no habían mostrado con anterioridad efectos adversos a agentes hipolipemiantes. Los participantes siguieron con su actividad física y su dieta habitual durante el período de tratamiento.

Los parámetros antropométricos para los 28 pacientes eran: peso de 72 ± 14 kg, altura de 160 ± 11 cm e índice de masa corporal (IMC) de $28,1 \pm 4,5$ kg/m². No se observaron diferencias en la edad, el peso, la altura y el IMC entre los diferentes grupos de tratamiento.

Diseño del estudio

El protocolo de este estudio ha sido descrito detalladamente con anterioridad²⁴. Al inicio del estudio, 48 pacientes fueron aleatorizados en 4 grupos de tratamiento: placebo, bezafibrato (400 mg), fenofibrato (200 mg) y gemfibrozilo (900 mg). Se administró el fármaco en una dosis única, antes de la cena, durante 8 semanas consecutivas. El cumplimiento de la medición se comprobó mediante el recuento de los comprimidos administrados. El protocolo fue aprobado por el comité ético y científico del Hospital Clínic de Barcelona y todos los pacientes fueron informados del tratamiento y aceptaron participar en él.

En el presente trabajo se ha estudiado únicamente a 28 pacientes (placebo: 7 pacientes; gemfibrozilo: 6 pacientes; bezafibrato: 6 pacientes; fenofibrato: 9 pacientes) dado que para el resto de ellos no se disponía de muestras de ARN.

Obtención de muestras

Al final del tratamiento se practicó a cada paciente una colecistectomía y se obtuvo una muestra de hígado de 30-60 mg mediante biopsia percutánea. Las muestras de tejido fueron inmediatamente congeladas en N₂ líquido hasta el momento de su utilización para la extracción del ARN. Las muestras de sangre para la determinación de los lípidos plasmáticos se obtuvieron al inicio y al final del tratamiento²⁴.

Análisis del ARN

La extracción del ARN total se llevó a cabo mediante el reactivio Ultraspec™ (Bioteck Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN se determinó a 260 nm y su integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, con un 2% de formaldehído y su posterior tinción con bromuro de etidio.

Los valores relativos de ARNm se determinaron mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), previamente descrita²⁵. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total, usando 125 ng de oligonucleótidos inespecíficos o cebadores (*random hexamers*, Promega), 20 U ARNsin, 200 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MVL-RT, Invitrogen) y 500 µmol/l de cada uno de los dNTP (Sigma-Aldrich) en un tampón que contenía 50 mmol/l de Tris-HCl (pH = 8.3), 75 mmol/l de KCl, 3 mmol/l de MgCl₂ y 10 mmol/l de DTT, todo ello en un volumen final de 20 µl. La reacción de RT se llevó a cabo a 37 °C durante 1 h.

La PCR se realizó a partir de una alícuota de 5 µl del producto de la reacción de RT, 0,5 µg de cada oligonucleótido específico (sentido y antisentido), 200 µmol/l de cada dNTP, 0,25 µCi de [³²P]-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham pharmacia biotech) y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), en presencia de tampón de 20 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,5) y

2,5 mmol/l de MgCl₂, en un volumen final de 50 µl. Para evitar hibridaciones inespecíficas, la enzima y el producto de la RT fueron separados de los oligonucleótidos específicos y dNTP mediante una capa de parafina que se funde cuando la reacción alcanza los 55-60 °C, dejando que los componentes entren en contacto. La reacción de la PCR se realizó en un Termociclador MJ Research (Ecogen) y consta de las siguientes fases: *a*) desnaturalización de los oligonucleótidos y ADNc a 94 °C durante 1 min; *b*) n ciclos de amplificación; cada ciclo consiste en una desnaturación a 92 °C durante 1 min, seguida de una hibridación con los oligonucleótidos específicos a 60 °C durante 1 min y 15 s, y una etapa de síntesis a 72 °C durante 1 min y 50 s, y *c*) etapa de síntesis final a 72 °C durante 5 min. Con el fin de descartar posibles contaminaciones se realizaron controles negativos en cada experimento. Asimismo, se diseñaron estudios previos para establecer las condiciones óptimas de amplificación de los diferentes genes a estudiar, determinando el número de ciclos y la cantidad de ARN necesaria para que la relación ARN/producto final fuera lineal y trabajáramos siempre por debajo de las condiciones de saturación²⁶. Para normalizar los resultados se usó el gen control GAPDH. La amplificación del gen problema y del gen control se realizó de forma paralela y por duplicado. El número de ciclos de amplificación utilizados en cada caso fue el siguiente: 25 para CYP7A1, MDR3, ABCG5 y ABCG8, 23 para HNF-4 y CLA-1 y 20 para GAPDH. Las secuencias de los oligonucleótidos específicos para cada gen y el tamaño que amplifican se describen en la tabla 1. Se sometieron 5 µl de la reacción de la PCR a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%; los productos de amplificación se visualizaron mediante la autoradiografía (films Kodak X-ray) y se cuantificaron las bandas radiativas por densitometría (Vilbert Lourmat Imaging). Todos los resultados se expresan como los valores de ARNm de cada uno de los genes estudiados normalizados por los valores de ARNm del gen control, GAPDH.

Estadística

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DE) y el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias significativas se establecieron mediante las pruebas de la t de Student para valores emparejados (análisis de los lípidos) y ANOVA con contraste *a posteriori* con el test de comparación múltiple de Student-Newmann's (análisis de ARNm). En caso de varianzas no homogéneas se aplicó una prueba no paramétrica. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p < 0,05.

Resultados

Lípidos plasmáticos

Los valores de lípidos plasmáticos que se obtuvieron para cada grupo de pacientes, antes y después del tratamiento, se muestran en la tabla 2. No se observaron diferencias significativas entre los valores de lípidos basales de los 4 grupos de tratamiento, y la administración de placebo no afectó al perfil lipídico del grupo. El tratamiento con fenofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo disminuyó los valores de triglicéridos plasmáticos en un 25, 33 y 35%, respectivamente, frente a sus valores basales. Las concentraciones de colesterol total y cLDL no

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados para la reacción de la proteína C reactiva

Genes	Secuencias sentido y antisentido	Producto PCR (bp)	Acceso GenBank
ABCG5	5'-ACCCAAAGCAAGGAACGGGAA-3' 5'-CAGCGTTCAGCATGCCCTGTG-3'	391	AF312715
ABCG8	5'-GGGTGAGCGCAGGAGAGTCAG-3' 5'-TCACGCTGCTTCCACACAGG-3'	491	AF320294
CLA-1	5'-ACGACACCGTGCTCCTCTCG-3' 5'-CGGGCTGTAGAACTCAGCGA-3'	509	Z22555
CYP7A1	5'-GGCAAACGGGTGAACCACCTC-3' 5'-CCCAGGCAGCGGTCTTGAGT-3'	420	X17595
GAPDH	5'-CAGTCCATGCCATCACTGCCA-3' 5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGCGC-3'	302	J04038
HNF-4	5'-GCCAGCATCGCAGATGTGTGT-3' 5'-TGCTCGATCATCTGCCAGGTG-3'	518	XM029795
MDR3	5'-GTCGCTGGTACCATCATGGC-3' 5'-CCAAACGGCTGCAGAGAGTCC-3'	532	M23234

Tabla 2. Valores de lípidos plasmáticos tras 8 semanas de tratamiento con placebo, fenofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo

Lípidos plasma (mg/dl)	Placebo n = 7		Fenofibrato n = 9		Bezafibrato n = 6		Gemfibrozilo n = 6	
	Inicio	Final	Basal	Tratamiento	Basal	Tratamiento	Basal	Tratamiento
Colesterol total	250 ± 37 (216-284)	244 ± 43 (204-283)	248 ± 26 (228-269)	194 ± 42 ^a (161-227)	252 ± 18 (233-271)	221 ± 17 ^a (203-239)	259 ± 41 (216-303)	229 ± 42 (184-273)
cLDL	158 ± 31 (129-186)	153 ± 32 (124-181)	166 ± 28 (145-187)	114 ± 41 ^a (83-145)	165 ± 18 (146-184)	142 ± 17 ^a (124-160)	171 ± 44 (125-217)	145 ± 36 (108-183)
cHDL	62 ± 12 (51-73)	56 ± 12 (45-67)	53 ± 14 (42-64)	58 ± 15 (46-69)	61 ± 13 (47-75)	65 ± 10 (54-76)	58 ± 23 (34-83)	61 ± 27 (33-89)
Triglicéridos	132 ± 31 (103-160)	130 ± 35 (97-162)	136 ± 41 (104-167)	102 ± 33 ^a (82-121)	129 ± 37 (90-167)	86 ± 28 ^a (57-115)	160 ± 52 (106-215)	104 ± 34 ^a (68-139)

cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad.

Valores expresados como media ± desviación estándar (intervalo de confianza del 95%). ^ap < 0,05 frente a los valores basales.

resultaron modificadas de forma significativa tras el tratamiento con gemfibrozilo, pero disminuyeron respecto a los valores iniciales tras la administración de fenofibrato (22 y 31%, respectivamente) y bezafibrato (12 y 14%, respectivamente). No se produjeron cambios significativos entre los valores plasmáticos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) obtenidos antes y después del tratamiento.

Efecto de los fibratos en los factores clave implicados en la síntesis de ácidos biliares y en la secreción de lípidos biliares

El tratamiento con los 3 fibratos, gemfibrozilo, bezafibrato y fenofibrato, redujo la expresión de la CYP7A1, respecto a la del grupo placebo, en un 50, 63 y 51%, respectivamente; en ninguno de los grupos resultaron afectados los valores de ARNm del HNF-4 (fig. 1 y tabla 3).

El ARNm de la MDR-3 también se incrementó ligeramente, pero los cambios observados no tuvieron significación estadística para ninguno de los grupos estudiados (fig. 2). Los valores de ARNm de ABCG5 se incrementaron en todos los grupos de tratamiento, pero únicamente el bezafibrato indujo cambios significativos (76% frente a grupo placebo; fig. 3). El tratamiento con fenofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo no modificó los valores de ARNm de CLA-1 ni de ABCG8 (tabla 3). Ante estos resultados podemos postular que los 3 fibratos ensayados presentan unos efectos similares, si bien el bezafibrato es el más potente. De hecho, cuando se analizaron conjuntamente los resultados obtenidos por los 3 grupos de fibratos, formando lo que denominamos grupo fármaco, se pudo observar que la administración de fibratos a humanos era capaz de producir un incremento del 47 y del 30% en los valores de ARNm de la ABCG5 y MDR3, respectiva-

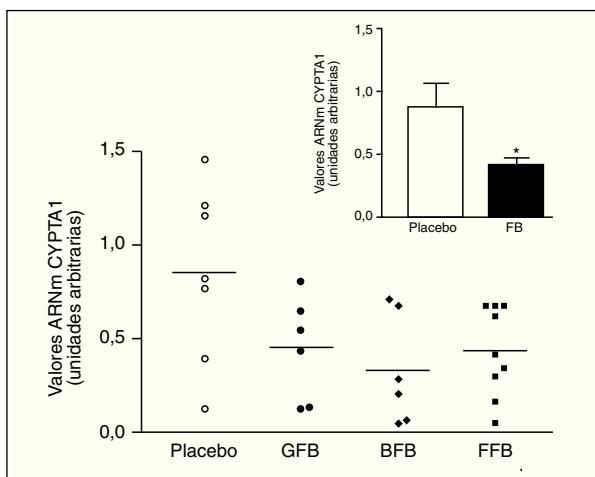


Figura 1. Efecto del tratamiento con gemfibrozilo (GFB), bezafibrato (BFB) y fenofibrato (FFB) en los valores de ARNm de la colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) en tejido hepático humano. Gráfico inferior: valores de ARNm de la CYP7A1 de cada paciente, normalizados por los valores de ARNm del gen control, GAPDH y determinados por la técnica de RT-PCR. Las diferencias entre gemfibrozilo, bezafibrato o fenofibrato y el grupo placebo resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Gráfico superior: valores de ARNm de la CYP7A1 expresados como media ± desviación estándar para el grupo placebo y el grupo global de pacientes tratados con fibratos (FB).

*Valores significativamente diferentes respecto a los del grupo placebo ($p < 0,01$).

mente, frente a placebo (ABCG5: $0,794 \pm 0,23$ y $1,17 \pm 0,42$ para grupo placebo y grupo fibrato, respectivamente; $p < 0,05$; MDR3: $0,688 \pm 0,22$ y $0,897 \pm 0,23$ para grupo placebo y grupo fibrato, respectivamente; $p < 0,05$).

Discusión

La administración de fibratos inhibe la síntesis de ácidos biliares mediante la disminución de la actividad colesterol 7 α -hidroxilasa en ratas^{5,14} y en humanos^{4,6}. A pesar de que recientemente se ha demostrado que los valores de ARNm de CYP7A1 se reducen en ratones tratados con fibratos y que este efecto desaparece por completo en ratones PPAR α (-/-)⁵, el papel del receptor PPAR α en el control de la expresión de CYP7A1 en humanos no está totalmente definido. Hay diferentes citas bibliográficas que ponen de manifiesto la actual controversia sobre los efectos de los agonistas de PPAR α en la actividad del promotor de la CYP7A1 en humanos²⁷⁻²⁹. Cheema y Agellon²⁷ muestran una inducción de la actividad del promotor de CYP7A1 en humanos tras la administración de agonistas PPAR α , mientras que autores como Marrapodi y Chiang²⁸ observan que un agonismo PPAR α es capaz de disminuir

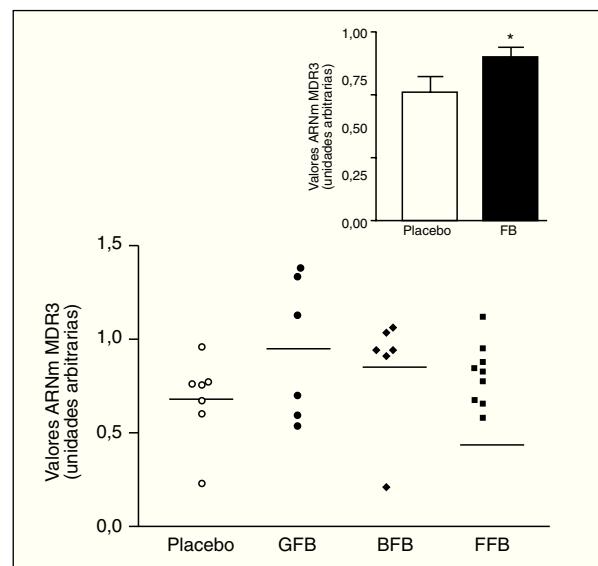


Figura 2. Efecto del tratamiento con gemfibrozilo (GFB), bezafibrato (BFB) y fenofibrato (FFB) en los valores de ARNm de MDR3 en tejido hepático humano. Gráfico inferior: valores de ARNm de MDR3 de cada paciente, normalizados por los valores de ARNm del gen control, GAPDH y determinados por la técnica de RT-PCR. Gráfico superior: valores de ARNm de MDR3 expresados como media ± desviación estándar para el grupo placebo y el grupo global de pacientes tratados con fibratos (FB).

*Valores significativamente diferentes respecto a los del grupo placebo ($p < 0,05$).

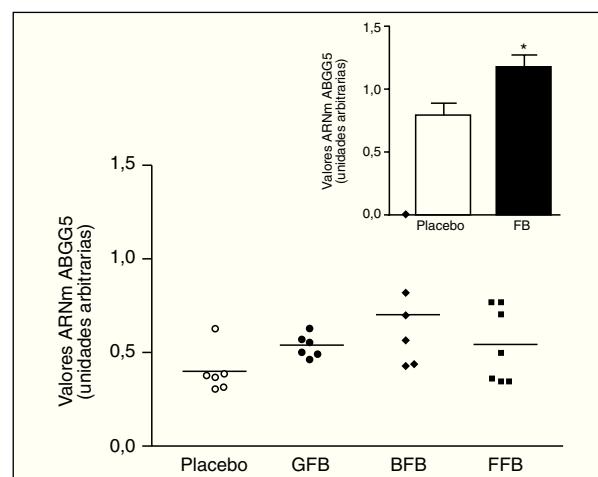


Figura 3. Efecto del tratamiento con gemfibrozilo (GFB), bezafibrato (BFB) y fenofibrato (FFB) en los valores de ARNm de ABCG5 en tejido hepático humano. Gráfico inferior: valores de ARNm de ABCG5 de cada paciente, normalizados por los valores de ARNm del gen control, GAPDH y determinados por la técnica de RT-PCR. Gráfico superior: valores de ARNm de ABCG5 expresados como media ± desviación estándar para el grupo placebo y el grupo global de pacientes tratados con fibratos (FB).

*Valores significativamente diferentes respecto a los del grupo placebo ($p < 0,05$).

Tabla 3. Efecto de los fibratos en los factores clave implicados en la síntesis y secreción de lípidos biliares

	Placebo (n = 7)	GFB (n = 6)	BFB (n = 6)	FFB (n = 9)
HNF-4	1,27 ± 0,32 (0,97-1,57)	1,42 ± 0,19 (1,22-1,63)	1,62 ± 0,24 (1,37-1,87)	1,09 ± 0,27 (0,88-1,30)
CLA-1	1,18 ± 0,14 (1,03-1,33)*	1,19 ± 0,06 (1,12-1,25)	1,20 ± 0,16 (1,03-1,37)	1,22 ± 0,23 (1,05-1,40)
ABCG8	0,66 ± 0,22 (0,46-0,86)	0,84 ± 0,40 (0,42-1,26)	0,76 ± 0,26 (0,49-1,03)	0,63 ± 0,13 (0,53-0,73)

BFB: bezafibrato; FFB: fenofibrato; GFB: gemfibrozilo.

*n = 6.

Resultados expresados como media ± desviación estándar (intervalo de confianza del 95%). Los valores de ARNm se exponen en unidades arbitrarias y corresponden a la relación entre el gen problema y el gen control, GAPDH.

la actividad del promotor de la CYP7A1 mediante la reducción de la expresión y disponibilidad de HNF-4 (un factor de transcripción implicado en la expresión basal de CYP7A1). En el presente estudio hemos podido observar que los valores de ARNm de la CYP7A1 se redujeron en los pacientes tratados con gemfibrozilo, bezafibrato y fenofibrato, sin que los valores de ARNm de HNF-4 resultaran afectados. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la disminución de la hidroxilación de colesterol, observada en humanos después del tratamiento con fibratos, se lleva a cabo por inhibición de la transcripción génica de la CYP7A1, sugiriendo que el receptor PPAR α podría estar implicado en la regulación de la expresión de esta enzima *in vivo*.

Los pacientes tratados con fibratos muestran cambios en la composición de los lípidos biliares, con incrementos en la concentración de colesterol y fosfolípidos³⁰. Actualmente se conoce poco acerca del efecto de los fibratos en la secreción biliar de lípidos en humanos. En nuestro estudio, los valores de ARNm de *MDR-3*, gen que controla la secreción de fosfolípidos en la bilis, se incrementaron tras la administración de fibratos. Algunos autores han postulado que *MDR-3* también podría estar implicado en el control de la secreción de colesterol en la bilis³¹. Otros factores, como CLA-1, ABCG5 o ABCG8, parecen estar implicados en este proceso de secreción. Nosotros hemos observado que los valores de ARNm de ABCG5 se incrementan con el tratamiento con fibratos, mientras que los de ABCG8 y CLA-1 no se modificaban. Ésta es la primera evidencia de que la expresión de MDR3 y ABCG5 se induce en humanos tratados con fibratos, lo que sugiere que estos efectos podrían ser la base del incremento de la concentración biliar de fosfolípidos y colesterol observada en pacientes tratados con estos fármacos. A pesar de que cam-

bios en la expresión de CYP7A1 y ABCG5 pueden provocar una saturación de colesterol en la bilis y llegar a producir cálculos biliares o colelitiasis, ninguno de nuestros pacientes tuvo que abandonar el estudio por efectos adversos derivados del tratamiento con fibratos²⁴. A partir de los resultados obtenidos podemos hipotetizar que el incremento de la expresión de MDR3 y el consiguiente aumento de fosfolípidos biliares compensa, en parte, la reducción de la concentración de ácidos biliares provocada por la terapia con fibratos. No obstante, este efecto podría ser insuficiente para solubilizar el exceso de colesterol en pacientes tratados durante un largo período con estos fármacos.

Para concluir, nuestros resultados muestran por primera vez que el tratamiento con fibratos reduce los valores de ARNm de CYP7A1 e incrementa los de ARNm de MDR3 y ABCG5 en el tejido hepático humano. Estos efectos podrían explicar los cambios observados en la composición de los lípidos biliares inducidos por este grupo de fármacos en humanos y contribuir a su efecto hipコレsterólico.

Bibliografía

- Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:717-26.
- Kesäniemi A, Grundy SM. Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man. JAMA 1984;251:2241-6.
- Einarsson K, Angelin B. Hyperlipoproteinemia, hypolipidemic treatment and gallstone disease. Atheroscler Rev 1986;15:67-97.
- Stahlberg D, Reihner E, Rudling M, Berglund M, Einarsson K, Angelin B. Influence of bezafibrate on hepatic cholesterol metabolism in gallstone patients: reduced activity of cholesterol 7 α -hydroxylase. Hepatology 1995;21:1025-30.
- Post SM, Duez H, Gervois PP, Kuipers F, Princen HMG. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. J Clin Endocrinol 2002;146:111-7.

- hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1840-5.
6. Bertolotti M, Concari M, Loria P, Abate N, Pinetti A, Guicciardi ME, et al. Effects of different phenotypes of hypercholesterolemia and of treatment with fibric acid derivatives on the rates of cholesterol 7alpha hydroxylation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1064-9.
 7. Princen HMG, Post SM, Twisk J. Regulation of bile acid biosynthesis. *Curr Pharm Des* 1997;3:59-84.
 8. Chiang JYL. Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci* 1998;3: D176-93.
 9. Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase: barely missing a SHP. *J Lipid Res* 2002;43:533-43.
 10. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992;31:4737-49.
 11. Wang DP, Stroup M, Marrapodi M, Crestani M, Galli G, Chiang JYL. Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A) in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1996;37:1831-41.
 12. Tobin KA, Steiniger HH, Alberti S, Spydevol O, Auwerx J, Gustafsson JK, et al. Cross-Talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2000;14:741-52.
 13. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 2001;262:257-65.
 14. Bocos C, Castro M, Quack G, Herrera E. Studies with etofibrate in the rat, II: a comparison of the effects of prolonged and acute administration on plasma lipids, liver enzymes and adipose tissue lipoplys. *Biochim Biophys Acta* 1993;1168:340-7.
 15. Combettes-Souverain M, Milliat F, Sérougne C, Férezou J, Lutton C. SR-BI et metabolisme du cholesterol. *Medicine/Sciences* 1999; 15:1252-8.
 16. Sehayek E, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, et al. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 10194-9.
 17. Fucks M, Ivandic B, Müller O, Schalla C, Scheibner J, Bartsch P, et al. Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Hepatology* 2001;33:1451-9.
 18. Mardones P, Quiñone V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-80.
 19. Schmitz G, Langmann T, Heimerl S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* 2001; 42:1513-20.
 20. Borst P, Zelcer N, Van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochem Biophys Acta* 2000;1486:128-44.
 21. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulaïn P, et al. CLA-1/SR-BI expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101:2411-7.
 22. Chianale J, Vollrath V, Wielandt AM, Amigo L, Rigotti A, Nervi F, et al. Fibrate induce mdr2 gene expression and biliary phospholipid secretion in the mouse. *Biochem J* 1996;314:781-6.
 23. Miranda S, Vollrath V, Wielandt AM, Loyola G, Bronfman M, Chianale J. Overexpression of mdr2 gene by peroxisome proliferators in the mouse liver. *J Hepatol* 1997;26:1331-9.
 24. Roglans N, Bellido A, Rodríguez C, Cabrero A, Novell F, Ros E, et al. Fibrate treatment does not modify the expression of acyl-coa oxidase in human liver. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:692-701.
 25. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced PPAR alpha expression and decreased plasma non-esterified fatty acids and liver triglyceride in fructose fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:232-9.
 26. Gause WC, Adamovicz J. Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression, in: PCR primer. En: Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
 27. Cheema SK, Agellon LB. The murine and human cholesterol 7 alpha hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 2000;275:12530-6.
 28. Marrapodi M, Chiang JYL. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and agonist inhibit cholesterol 7 alpha hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Lipid Res* 2000;41:514-20.
 29. Patel DD, Knight BL, Soutar AK, Gibbons GF, Wade DP. The effect of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha on the activity of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene. *Biochem J* 2000;351:747-53.
 30. Stahlberg D, Reihné E, Ewerth S, Einarsson K, Angelin B. Effects of bezafibrate on hepatic cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40:S33-6.
 31. Müller M. Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Sem Liver Dis* 2000;20:323-37.