Estudio del mecanismo de acción hipolipemiante de la lovastatina en la rata

I.C. López-Pérez, E. Relaño, E. Herrera y C. Bocos

Departamento de Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo-CEU. Madrid. España.

Fundamento. Las estatinas son agentes hipolipemiantes que no sólo mejoran la concentración de colesterol sino también la de triglicéridos (TG). Mientras su acción hipocolesterolemiante implica la inhibición de la colesterogénesis a través de su acción sobre la HMG-CoA reductasa, el mecanismo de su acción hipotrigliceridemiante no es tan conocido. El receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo alfa (PPARα) es clave en el metabolismo lipídico y se ha relacionado con la afectación farmacológica de la trigliceridemia (tal es el caso de fibratos).

Métodos. El presente trabajo se ha llevado a cabo para determinar el efecto agudo de una dosis elevada de lovastatina sobre la expresión hepática de dicho receptor en ratas normolipémicas, así como de alguno de sus genes diana. Paralelamente, se realizó un estudio *ex vivo* de la actividad lipolítica del tejido adiposo blanco.

Resultados. A 1,5, 3 y 7 h (tiempos de estudio) de la administración del fármaco no hubo afectación de la colesterolemia y, aunque tampoco parecía verse afectada la concentración de TG en plasma, sí que se observaba una acción hipotrigliceridemiante a las 7 h. En cuanto a las expresiones de PPARα y la de su gen diana, acil-CoA oxidasa peroxisomal *(*ACO*)*, se comportaron de manera paralela, esto es, una tendencia significativa a aumentar en los animales tratados a las 7 h de la administración. En cuanto a la expresión de apolipoproteína CIII no había cambios, y la de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) parecía responder bien en los dos grupos al perfil de FFA en plasma. En cuanto a la lipólisis, cuyos valores basales se incrementaron a lo largo del estudio, se veía considerablemente reducida por acción del fármaco a las 7 h, mientras que, curiosamente, a las 3 h de la administración el tejido adiposo de las ratas tratadas parecía más sensible a la adrenalina que el de las controles.

Conclusiones. Por todo ello, el efecto hipotrigliceridemiante de la lovastatina parece estar relacionado con una inducción de la expresión hepática de PPARα y de genes de la ß-oxidación peroxisomal y con un efecto antilipolítico en el tejido adiposo.

Palabras clave:
Estatinas. PPAR. Expresión génica. Lipólisis. Triglicéridos.

STUDY OF THE MECHANISM OF HYPOLIPEMIANT EFFECT OF LOVASTATIN IN THE RAT

Background. Statins are hypolipidemic drugs that not only improve cholesterol but also triglyceride levels. Whereas their cholesterol-lowering effect involves inhibition of cholesterogenesis through inhibition of enzyme 3-hidroxy-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase, the mechanism by which they reduce triglycerides remains unknown.

Este trabajo recibió una Mención Especial del Comité Científico de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) en el XV Congreso Nacional de la SEA celebrado en Salamanca.

Correspondencia: Dr. C. Bocos.
Laboratorio de Biología Molecular.
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud.
Universidad San Pablo-CEU.
Ctra. Boadilla del Monte, km 5,300.
28668 Boadilla del Monte. Madrid. España.
Correo electrónico: carbocos@ceu.es

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-α) is crucial in lipid metabolism and has been related to the pharmacologic effect on triglyceridemia (as is the case of fibrates).

Methods. This study was carried out to determine the effect of acute administration of a high dose of lovastatin on hepatic expression of both PPAR-α and some of its target genes in normolipidemic rats. In parallel, the ex vivo lipolytic activity of white adipose tissue from the same rats was also studied.

Results. Cholesterolemia was not affected by the drug at the times considered (1,5, 3 and 7 hours after administration of the drug) and, although triglyceridemia did not seem to be affected by the treatment, a hypotriglyceridemic effect was observed at 7 hours after administration. Expression of PPAR-α and its target gene, peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACO) were similarly affected by the treatment, showing a trend to increase in treated animals. This increase was statistically significant at 7 hours. Expression of apolipoprotein CIII remained unchanged but that of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) seemed to be sensitive to the plasma FFA profile in both animal groups. Regarding adipose tissue lipolytic activity, the basal values, which increased throughout the study, were markedly reduced by lovastatin at 7 hours after administration. However, at 3 hours after administration adipose tissue from treated rats seemed to be more sensitive to epinephrine than tissue from control rats.

Conclusions. The results of this study suggest that the hypotriglyceridemic effect of lovastatin is related to both induction of hepatic expression of PPAR-α and genes related to peroxisomal β-oxidation, as well as to the antilipolytic effect on adipose tissue.

Key words:
Statins. PPAR. Gene expression. Lipolysis. Triglycerides.

Introducción

Las estatinas son agentes hipolipemiantes que reducen la concentración de colesterol, aunque también se ha descrito que disminuyen la de triglicéridos. Es bien sabido que su acción hipocolesterolemiante implica la inhibición de la síntesis *de novo* del colesterol celular a través de la inhibición competitiva de la enzima limitante de la vía, la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, el mecanismo de su acción hipotrigliceridemiante no es tan conocido y ello fue el propósito del presente estudio. Así, y con objeto de remarcar los posibles efectos que la estatina tuviera sobre los parámetros aquí estudiados, se utilizó una dosis elevada de fármaco, aunque del mismo orden de magnitud que las usadas en otros estudios[1-3]. En circunstancias normales, las concentraciones plasmáticas de lovastatina en pacientes que reciben esta terapia son bajos. Sin embargo, hay ciertas ocasiones, como ocurre en los pacientes transplantados que reciben ciclosporina junto con estatinas, en los que las concentraciones de lovastatina en plasma pueden llegar a ser veinte veces superiores, por lo que no se recomienda la toma conjunta de ambos fármacos[4,5]. Aún más, el citado efecto hipotrigliceridemiante de la lovastatina es, en estos casos, también evidente[5-7].

El receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPARα), proteína clave en el metabolismo lipídico y lipoproteico[8], se ha relacionado con la reducción farmacológica de la hipertrigliceridemia, en concreto con el mecanismo de acción de fibratos[9]. Se ha descrito que las estatinas son también capaces de estimular la expresión y/o actividad transcripcional del PPARα en determinadas circunstancias: *in vitro*, en células de glioma humano[10], en células de hepatoma humano[11] y en hepatocitos humanos[12]; e *in vivo*, en hígado de ratas hipertrigliceridémicas por una dieta rica en fructosa[13].

La activación del PPARα puede influir en las concentraciones de triglicéridos ya que dicha activación suele venir acompañada de un aumento concomitante del catabolismo hepático de los ácidos grasos y, por tanto, comprometiendo el suministro de sustratos para la síntesis de triglicéridos y su liberación a la circulación desde el hígado. No obstante, existen otros posibles puntos de regulación. Así, por ejemplo, la liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo, el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por los tejidos extrahepáticos, la captación de los FFA por los tejidos y la propia síntesis hepática de TG. Sin embargo, de todos ellos, la actividad lipolítica del tejido adiposo no ha sido contemplada como posible sitio de actuación de las estatinas, que pudiera ayudar a explicar su acción hipotrigliceridemiante.

Por todo ello, en el presente estudio se investigó el efecto del tratamiento agudo con una dosis elevada de lovastatina en ratas normolipémicas, interesándonos principalmente su acción sobre la trigliceridemia. Por ello, nos centramos en dos rutas relacionadas con el suministro adecuado de FFA

para la síntesis hepática de triglicéridos: el catabolismo hepático de ácidos grasos libres y su liberación a la sangre desde el tejido adiposo.

Material y métodos

Material

La lovastatina fue cedida por Merck Sharp & Dohme de España, S.A.

Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 210-225 g, alimentadas *ad libitum* con pienso de mantenimiento RMM (Harlan Interfauna Ibérica, S.A.) y sometidas a un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con una temperatura estable de 20-24 °C y una humedad relativa de 55 ± 10%. Se administró una única dosis de lovastatina de 500 mg/kg de peso corporal o bien el vehículo (Tween-80 al 2%) mediante sonda gástrica, sin anestesia, a las 9:00 h de la mañana. A 1,5, 3 y 7 h después de dicha administración, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina y sin anestesia. Un lote de animales, elegidos al azar y que no habían recibido tratamiento alguno, fueron igualmente sacrificados a las 9:00 h de la mañana y representaron el grupo experimental de tiempo 0; esto es, previo a la administración. El tejido adiposo epididimal fue recogido en suero salino para seguidamente realizar los estudios de actividad lipolítica. Tanto el hígado como los primeros 10-12 cm del intestino delgado a partir del estómago (considerados como duodeno) fueron extraídos e inmediatamente sumergidos en N_2 líquido y almacenados a –80 °C hasta su procesamiento para realizar estudios de expresión génica. La sangre fue recogida en un tubo con EDTA, y tras centrifugación el plasma se congeló a –20 °C para subsiguientes valoraciones.

Parámetros plasmáticos

El colesterol, los triglicéridos y los ácidos grasos libres (FFA) fueron valorados empleando *kits* comerciales (Menarini, en los dos primeros casos y Wako Chemicals, en el último). El glicerol plasmático fue valorado siguiendo el método descrito por Garland y Randle[14], previa desproteinización del medio[15].

Análisis del ARN

El ARN de las muestras de hígado obtenidas a las 3 y 7 h tras la administración de la lovastatina o del placebo fue extraído empleando el reactivo Ultraspec™ (Biotecx Labs), según indicaciones del fabricante. La concentración del ARN total extraído se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm, obteniéndose en todos los casos una relación de absorbancias a 260/280 entre 1,8 y 2,0. Fueron desnaturalizados 10, 20 y 30 µg de ARN total y se fijaron en una membrana de nylon Hybon™-N (Amersham Pharmacia), para los análisis de *dot blot* (PPARα). Por otro lado, 20 µg del ARN total extraído fueron desnaturalizados, separados en un gel al 1,2% de agarosa y formaldehído y transferidos a una membrana de nylon, para los análisis de Northern blot (PEPCK, ACO y apo-CIII). Se utilizaron los siguientes fragmentos del ADN complementario de rata: del PPARα (cedido por Hebe Guardiola-Díaz y J.Å. Gustaffson, Instituto Karolinska, Suecia), de la PEPCK (obtenido de D.K. Ganner, Vanderbilt University Medical School, EE.UU.), de la ACO (donado por T. Osumi, Harima Science Park City, Japón), de la apolipoproteína CIII (cedido por J. Auwerx, Instituto Pasteur, Francia) y del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), que fue obtenido por PCR[16]. Las sondas fueron marcadas con [α-^{32}P]-dCTP mediante el *kit* Megaprime™ (Amersham Pharmacia) e hibridadas con las membranas a 42 °C durante una noche. Después fueron lavadas dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% a 42 °C, en el caso del PPARα y a 53 °C, para los restantes. Tras los lavados, las membranas se pusieron en contacto con una película fotográfica X-OMAT-AR (Kodak) y se dejaron impresionar a –80°C en un intervalo de tiempo entre 1 y 7 días. Tras su revelado, la intensidad de las bandas de la autorradiografía se cuantificó mediante densitometría utilizando un escáner GS-700 Imaging Densitometer (Biorad) y el programa informático Molecular Analyst™ 1.4 (Biorad). Posteriormente, las membranas eran deshibridadas en un baño a 75 °C, 1 h, con una solución de SSC 1X, SDS 0,5% y pirofosfato sódico 0,1%, con agitación suave, para su posterior reutilización. Para los análisis de *dot blot*, la linealidad de la relación entre la intensidad de la señal y la concentración de ARN se confirmó para cada muestra y sonda utilizadas.

RT-PCR semicuantitativa

El ARN total de las muestras de duodeno era extraído empleando RNeasy Mini kit (Qiagen), según indicaciones del proveedor. Tres µg de ARN eran tratados con DNasa I, libre de RNasas (Roche), tras lo cual se llevaba a cabo la transcripción inversa. Para ello, el ARN junto con oligo-dT 3,5 µM (Sigma) eran sometidos a 70 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadía el tampón 1X First Strand (Gibco), 10 mM de DTT (Gibco) y 2 mM de dNTPs (Roche), sometiéndose la mezcla a 42 °C durante 2 min. Por último, se añadieron 10 U/µl de la enzima Superscript™ II RNase H– Reverse transcriptase (Gibco), incubándose todo ello a 42 °C durante 50 min, seguido de otros 15 min a 70 °C. Para llevar a cabo el paso correspondiente a la PCR, en el caso del PPARα la secuencia de los cebadores empleados fue la siguiente: PPARα sense, 5'-CCT TTT TGT GGC TGC TAT-3' y PPARα antisense, 5'-TCC CTG CTC TCC TGT ATG-3'. La mezcla de PCR consistía en 800 µM de dNTPs, 0,8 pmol/µl de cada cebador y 0,5 U de la enzima Taq DNA polymerase (Biotools). La reacción de PCR fue: 94 °C, 3 min, 35 ciclos (94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 60 s), y para finalizar, 72 °C, 5 min. Para la G3PDH, empleada como control, la secuencia de los cebadores fue: G3PDH sense, 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' y G3PDH antisense, 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'. La mezcla de reacción en este caso fue 800 µM de dNTPs, 0,8 pmol/µl de cada cebador y 1,5 U de la enzima AccuTaq™ LA DNA polymerase (Sigma). La reacción de PCR fue: 94 °C, 4 min y 30 s, 35 ciclos (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 60 s), y finalmente, 72 °C, 5 min. En ambos casos, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Tras tinción con bromuro de etidio, la intensidad de las bandas se cuantificó mediante densitometría, utilizando un escáner GS-700 Imaging Densitometer (BioRad) y utilizando el programa informático Molecular Analyst™ 1.4 (BioRad).

Estudio de la actividad lipolítica

El tejido adiposo epididimal fue empleado para determinar la actividad lipolítica según un método previamente descrito[17]. Así, inmediatamente después de su extracción, el tejido fue troceado, secado y pesado hasta obtener una cantidad aproximada de 0,7 g. Éste fue digerido en una disolución que contenía 1 mg/ml colagenasa A (Roche) en tampón Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) suplementado con 5,5 mM de glucosa y 4% de albúmina bovina (BSA) libre de ácidos grasos, a pH 7,4. Tras incubación a 37 °C y gaseo con carbógeno durante 30 min, se filtró la solución resultante y los adipocitos obtenidos

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de lípidos

Parámetro	Tratamiento	Tiempo tras la administración (horas)			
		0	1,5	3	7
Colesterol (mg/dl)	Control	111,7 ± 5,4	78,5 ± 1,1	90,4 ± 2,4	84,6 ± 4,8
	Lovastatina		77,8 ± 1,2	83,1 ± 2,9	90,5 ± 3,4
Triglicéridos (mg/dl)	Control	103,6 ± 11,9	80,3 ± 15,1	81,4 ± 2,9	86,9 ± 13,3
	Lovastatina		97,6 ± 16,3	93,6 ± 6,2	52,4 ± 4,4*
Ácidos grasos libres (µM)	Control	308,6 ± 61,6	373,5 ± 31,7	506,3 ± 25,3	477,0 ± 58,7
	Lovastatina		495,2 ± 84,4	466,0 ± 45,3	458,4 ± 45,3
Glicerol (µM)	Control	54,6 ± 13,6	49,2 ± 14,2	85,9 ± 4,1	85,7 ± 1,9
	Lovastatina		70,3 ± 5,7	85,0 ± 9,4	80,7 ± 7,5

El tiempo 0 corresponde al momento previo a la administración. Los valores representados son las medias ± error estándar (n = 6). *p < 0,05, comparación entre los dos grupos experimentales.

eran resuspendidos en tampón KRB 5,5 mM glucosa 4% BSA. Alícuotas de dicha resuspensión eran incubadas en presencia de 10 mU de adenosina deaminasa (Sigma) y distintas concentraciones de adrenalina (10 a 1.000 nM) (Sigma) durante 90 min a 37 °C con agitación de 60-70 ciclos/min. La reacción era detenida colocando los viales de incubación en un baño de hielo y congelación inmediata a –20 °C. Posteriormente, el glicerol liberado al medio era determinado utilizando un *kit* comercial (triglicérido GPO-Trinder, Sigma). Por otro lado, y en paralelo, alícuotas de los adipocitos, iguales a las usadas en la incubación, eran sometidas a extracción con una mezcla de isopropanol-heptano (4:1), para hacer una estimación de la cantidad de lípidos totales existentes en el tejido en cada tubo de incubación.

Expresión de los resultados

Los valores corresponden a la media de los datos ± el error estándar y fueron comparados aplicando un test ANOVA de una vía, en el caso del estudio de la actividad lipolítica y de los parámetros plasmáticos, y el de la t de Student, en el caso de los valores de expresión génica.

Resultados

Efecto de la lovastatina sobre las concentraciones de lípidos en plasma

La administración de una única dosis elevada de lovastatina a ratas normolipémicas no produjo cambios en la concentración plasmática de colesterol a ninguno de los tiempos estudiados, si lo comparamos con los datos obtenidos en las ratas control (tabla 1). Algo semejante se observó para los triglicéridos en plasma, a excepción de lo que ocurría a las 7 h de la administración, donde se observó una clara tendencia hipotrigliceridemiante de la lovastatina. En cuanto a las concentraciones plasmáticas de FFA y glicerol, sus valores (tabla 1) aumentaron a lo largo del estudio en los dos grupos, si bien en el caso de los animales tratados con lovastatina ese aumento fue más rápido, observándose ya a las 1,5 h, aunque la diferencia no llegara a resultar estadísticamente significativa.

Efecto de la lovastatina sobre la expresión hepática de PPARα y genes relacionados

La expresión hepática de PPARα tiende a aumentar a lo largo del día en las ratas controles, efecto que se potencia en las ratas tratadas con lovastatina, de manera que a las 7 h de la administración, la diferencia de expresión entre los dos grupos era evidente, aunque no llegó a ser significativa (fig. 1). No obstante, el estudio de la expresión de este mismo gen por técnicas más sensibles (RT-PCR) en el duodeno de estos mismos animales mostró que, aunque a las 3 h del tratamiento no había diferencias (controles, 100 ± 30% frente a tratadas, 99 ± 5%), sí que se llegaron a encontrar cambios significativos entre los dos grupos a las 7 h de la administración (controles, 77 ± 24% frente a tratadas, 184 ± 14; p < 0,05).

Por otro lado, la expresión hepática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) parece verse afectada tanto por el tratamiento como por el tiempo de experimento transcurrido (tabla 2). Así, si se comparan los datos obtenidos para las ratas controles a las 3 y 7 h, se puede observar que al transcurrir el día aumenta la expresión de esta enzima. Además, la lovastatina llega a estimular de manera significativa la expresión de este gen a las 3 h, aunque no a las 7, si bien esto podría deberse a un enmascaramiento del efecto del fármaco por el aumento que ya de por sí se observa en las ratas controles a las 7 h. En cuanto a la expresión de la acil-CoA oxidasa (ACO) peroxisomal (tabla 2), muestra un gran paralelismo a lo comentado para la expresión del PPARα, esto es, el fármaco tiende a aumentar su expresión llegando a producir una diferencia significativa respecto a las ratas controles a las 7 h del tratamiento. Para el caso de la expresión de la apolipoproteína CIII (tabla 2), no se detectó cambio alguno por causa del tratamiento.

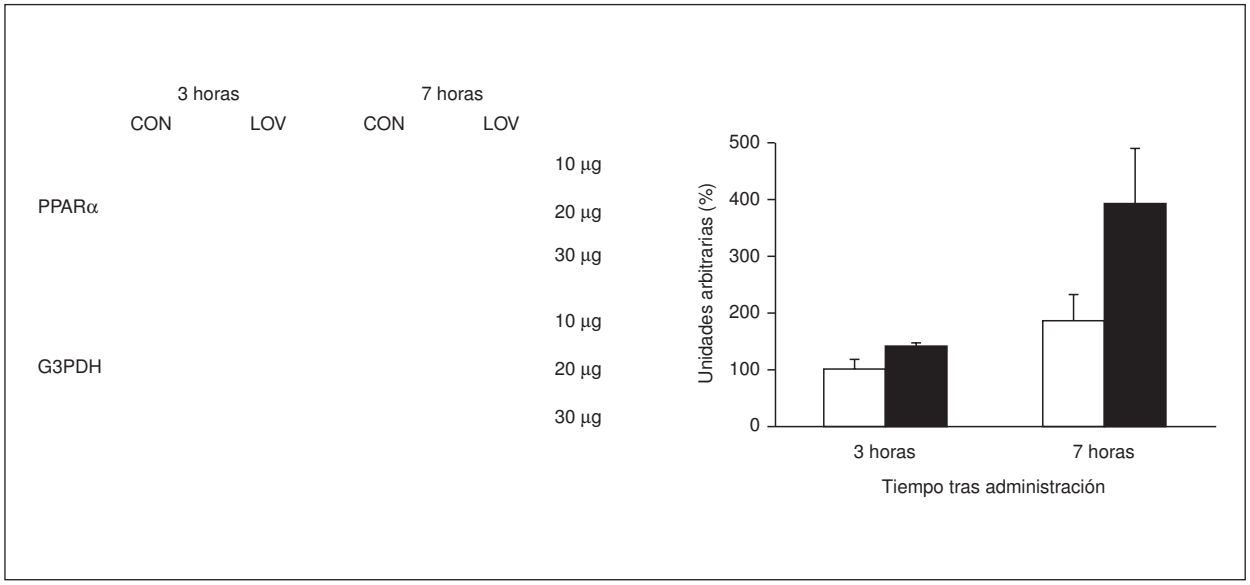

Figura 1. Efecto de la administración de lovastatina sobre la expresión hepática de PPARα. Izquierda: autorradiografía representativa de las señales correspondientes al ARNm del PPARα y del gen G3PDH utilizado como control, para un animal en cada una de las condiciones estudiadas. Igualmente, se indica la cantidad de ARN utilizado en cada caso (CON: control; LOV: lovastatina). Derecha: la cantidad relativa de ARNm para PPARα, determinada por la densitometría de las bandas y normalizada con los datos obtenidos para el ARNm de G3PDH, se representa usando unidades arbitrarias y considerando el valor del 100% al valor medio obtenido para los animales controles a las 3 h de la administración. Cada valor representa la media ± error estándar para cuatro animales.

Efecto de la lovastatina sobre la actividad lipolítica del tejido adiposo

La actividad lipolítica del tejido adiposo fue estudiada *ex vivo* en ratas controles y tratadas, tanto en condiciones basales como en respuesta dependiente de la dosis a adrenalina (fig. 2). Así, la lipólisis del tejido adiposo epididimal no difería entre ratas controles y las que recibían lovastatina a las 1,5 h de la administración (fig. 2, A), tanto si los datos se representaban en valores absolutos como en porcentaje frente al control respectivo (condición basal sin estimulación). Sin embargo, cuando el tejido adiposo procedía de ratas a las que se les había administrado la lovastatina 3 h antes, se observaba una mayor respuesta a la adrenalina, ya que a partir de 100 nM de esta hormona, los adipocitos procedentes de ratas que habían recibido la lovastatina liberaban más glicerol al medio que los de las controles (fig. 2, B). Curiosamente, el tejido adiposo de las ratas que habían recibido el tratamiento 7 h antes, parecía presentar un efecto inverso que el observado a las 3 h, esto es, una menor respuesta a la adrenalina que en el tejido adiposo proveniente de las ratas controles. Sin embargo, si se observa la gráfica correspondiente a los valores expresados en porcentajes, se puede observar claramente que la respuesta a la adrenalina resultó ser la misma en ambos casos, lo que variaba era el valor lipolítico basal (fig. 2, C), como se comentará a continuación.

Tabla 2. Efecto de la administración de lovastatina sobre la expresión hepática de genes relacionados con PPARα

	PEPCK		ACO		apo CIII	
Tiempo (horas)	Control	Lovastatina	Control	Lovastatina	Control	Lovastatina
3	100,0 ± 22,6	185,0 ± 9,3[a]	100,0 ± 2,4	123,5 ± 19,9	100,0 ± 2,0	112,7 ± 2,3
7	181,9 ± 17,8[b]	180,1 ± 31,9	132,4 ± 10,4	168,9 ± 7,3[a]	106,9 ± 1,5	104,6 ± 4,9

Tras autorradiografía de las membranas Northern blot, la cantidad relativa de ARNm para cada gen correspondiente, determinada por densitometría de las bandas y normalizada con los datos obtenidos para el ARNm de G3PDH, se presenta usando unidades arbitrarias y considerando el valor del 100% al valor medio obtenido para los animales controles a las 3 h de la administración. Los valores representados son las medias ± error estándar (n = 4). [a]p < 0,05, comparación entre los dos grupos experimentales; [b]p < 0,05, comparación entre los tiempos de estudio, dentro de cada grupo.

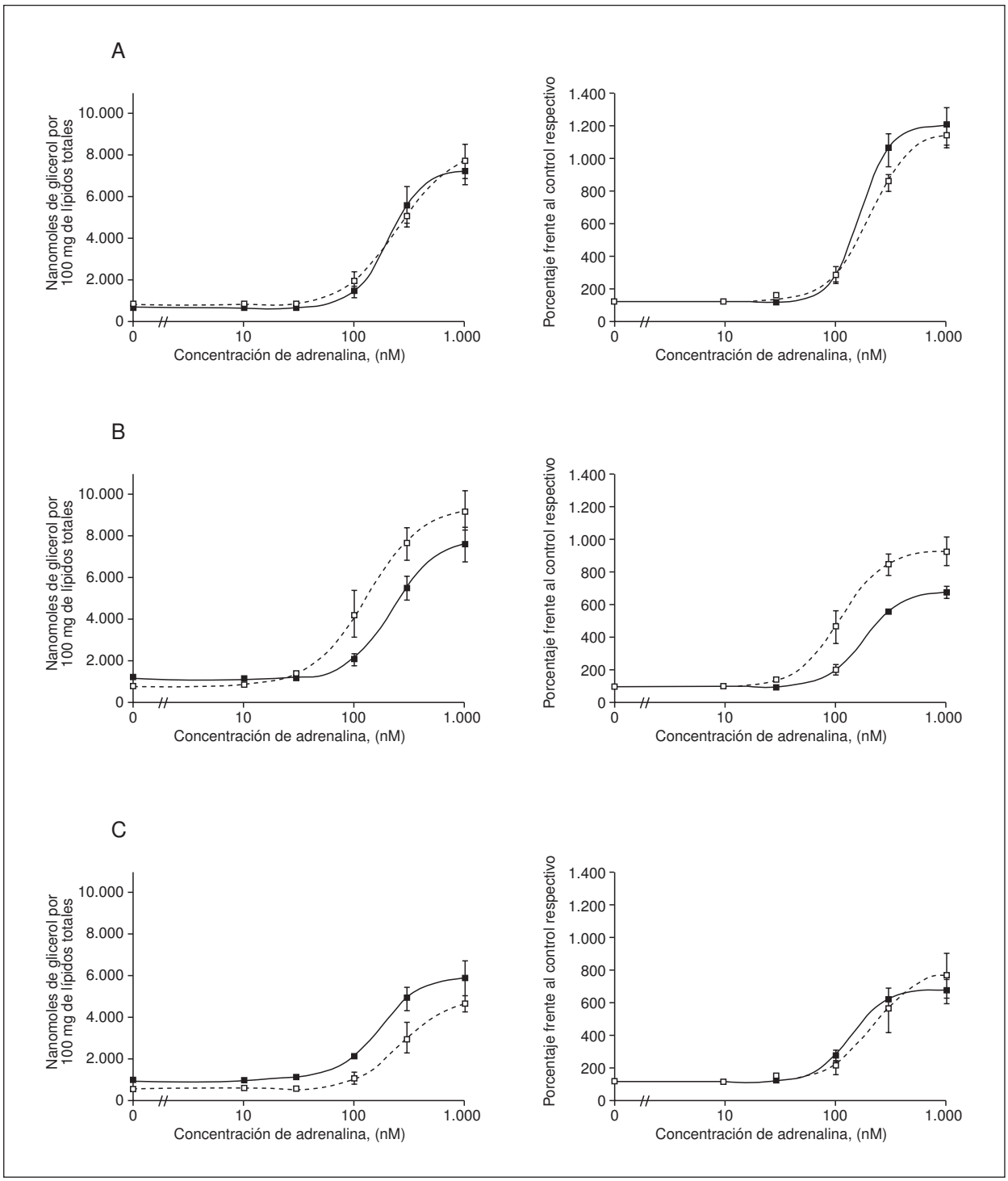

Figura 2. Efecto de la administración de lovastatina en la actividad lipolítica del tejido adiposo epididimal. Curvas dosis-respuesta a la adrenalina de la actividad lipolítica *ex vivo* de adipocitos aislados a partir del tejido adiposo epididimal de animales tratados con lovastatina o el medio, a diferentes tiempos tras la administración: A, 1,5 h; B, 3 h; C, 7 h. Los datos se expresan: en las gráficas de la izquierda, en valores absolutos (nanomoles de glicerol liberados al medio de incubación por cada 100 g de lípidos totales), o bien en las gráficas de la derecha, en porcentaje frente a la liberación basal de glicerol (ausencia de adrenalina). Se representan tanto los datos experimentales obtenidos para cada grupo (■ controles; □ lovastatina) como la representación de la ecuación de Hill que mejor se ajusta a dichos datos (línea continua, controles; línea discontinua, lovastatina). Cada valor representa la media ± error estándar de seis ratas por grupo experimental.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos y de lipólisis basal

	Lipólisis basal (nmol glicerol/100 mg de lípidos totales)			EC_{50} (nM)			Respuesta máxima (porcentaje frente a lipólisis basal)		
Tiempo (horas)	Control	p	Lovastatina	Control	p	Lovastatina	Control	p	Lovastatina
1,5	556,7 ± 78,9[a]	ns	699,1 ± 88,6[a,b]	182,6 ± 25,7	ns	203,6 ± 38,0	1171,3 ± 117,7[a]	ns	1118,3 ± 78,3[a]
3	991,5 ± 134,1[b]	ns	985,7 ± 104,5[a]	188,8 ± 26,0	< 0,05	117,8 ± 17,6	678,5 ± 41,0[b]	< 0,05	924,4 ± 82,1[a,b]
7	929,3 ± 87,1[b]	< 0,05	498,7 ± 111,8[b]	171,2 ± 29,9	ns	171,6 ± 37,3	662,9 ± 83,5[b]	ns	754,0 ± 133,5[b]

Los valores representados son las medias ± error estándar (n = 6). La comparación entre los dos grupos experimentales para cada tiempo estudiado y parámetro, se presenta directamente en la tabla (ns: no significativo). Las letras superíndices corresponden a la comparación estadística entre los diferentes tiempos de estudio para cada grupo experimental, de manera que los valores que no tienen una letra superíndice igual son significativamente diferentes con una $p < 0,05$.

De hecho, como se puede observar en la tabla 3, la lipólisis basal del tejido adiposo (en ausencia de adrenalina) parecía aumentar con el transcurso del día, tanto en las ratas controles como en las que recibieron lovastatina. Sin embargo, a las 7 h de recibir la lovastatina, la lipólisis basal no continúa aumentada sino que, por el contrario, se encuentra reducida de forma significativa (tabla 3). En cuanto a la concentración de adrenalina en el medio de incubación necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima del tejido (EC_{50}), se pudo observar (tabla 3) que en el tejido adiposo de las ratas controles no había cambio alguno entre los tres tiempos estudiados, mientras que en el tejido procedente de los animales tratados con lovastatina había una drástica reducción a las 3 h de haber recibido el fármaco, lo que producía, en ese tiempo de estudio, una diferencia significativa entre las ratas controles y las tratadas. Para el caso de la respuesta máxima (tabla 3), en los animales controles se pudo observar un valor significativamente mayor si el estudio se realizaba a las 1,5 h del comienzo del experimento que si se llevaba a cabo a las 3 o a las 7 h, lo cual concordaría con los resultados observados en lipólisis basal para estos animales (tabla 3). Sin embargo, en el caso de los animales tratados, la elevada respuesta máxima a la adrenalina, observada a las 1,5 h del estudio, se mantuvo a las 3 h, pero no a las 7, por lo que se observó una diferencia significativa a las 3 h del estudio entre la respuesta máxima del tejido adiposo de las ratas controles y el de las tratadas.

Discusión

El efecto hipotrigliceridemiante de las estatinas es un hecho constatado[2,18-20], que ha recibido diversas explicaciones. Por un lado se ha considerado que se estaría comprometiendo la salida de lipoproteínas ricas en triglicéridos al hallarse reducida la síntesis hepática de colesterol (otro componente de esas lipoproteínas) por dichos inhibidores de la HMG-CoA reductasa[18]. Es más, se ha observado que las estatinas son más eficaces en la rata disminuyendo las concentraciones de triglicéridos en plasma que las del propio colesterol[13,18]. De hecho, en el presente estudio éste parece ser el caso, ya que la acción hipotrigliceridemiante de la lovastatina (observada a las 7 h de la administración) no se correspondía con un efecto similar en la colesterolemia, que no cambiaba a lo largo del estudio entre los animales tratados y los controles. La falta de efecto hipocolesterolemiante de estatinas en rata ha sido descrito en numerosos trabajos e incluso en alguno llegaron a observar cómo una única dosis elevada de pravastatina (500 mg/kg) a ratas tan sólo era capaz de producir una ligera disminución del colesterol plasmático 9 h después de haber sido administrado el fármaco[1] (referencias en este trabajo).

Por otro lado, el efecto hipotrigliceridemiante se ha achacado a una estimulación directa de las estatinas sobre el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos mediado por la lipoproteína lipasa en los tejidos extrahepáticos[2]. De hecho, estos autores observaron cómo una dosis diaria de 250 mg/kg de simvastatina durante 4 días conseguía reducir la expresión hepática de la apolipoproteína CIII, potencial inhibidor de la lipoproteinlipasa, si bien una dosis de 125 mg no llegaba a ser suficiente para conseguir tal efecto. Por el contrario, en el presente estudio una única dosis de 500 mg/kg de lovastatina no afectaba, en los tiempos estudiados, a la expresión de dicha apolipoproteína, por lo que presumiblemente el efecto hipotrigliceridemiante de la lovastatina aquí observado no podría explicarse como fruto de una reducción en la cantidad del inhibidor de la lipoproteinlipasa, apo-CIII, y por tanto, de un aclaramiento favorecido de lipoproteínas ricas en triglicéridos.

En un reciente trabajo, Roglans et al[13] pudieron observar en ratas hipertrigliceridémicas por fructosa que el tratamiento durante 2 semanas con una dosis de 30 mg/kg de atorvastatina conseguía reba-

jar las concentraciones plasmáticas de triglicéridos al valor del de las ratas control. Uno de los efectos que proponían como explicación a ese resultado era la estimulación concomitante por la estatina de las expresiones hepáticas de PPARα, de la ACO, y de la CPT-I, así como de la actividad de la ß-oxidación, parámetros todos ellos reducidos por la alimentación con fructosa, que estaría generando un mayor catabolismo de los FFA y, por tanto, una menor síntesis hepática de triglicéridos. Precisamente en nuestro estudio hemos observado en ratas normolipémicas cómo una única dosis elevada de lovastatina es ya capaz de promover la expresión del PPARα (tanto en hígado como en duodeno), lo que estaría indicando que este fármaco es capaz de regular la expresión de PPAR sin necesidad de que previamente esté disminuida. Igualmente, la expresión de ACO en hígado se encontraba también aumentada por efecto de la lovastatina. Una estimulación paralela de las expresiones de PPAR y ACO en hígado ya la habíamos encontrado anteriormente[21], aunque en ese estudio se achacó a las concentraciones elevadas de FFA en plasma. Sin embargo, éste no sería el caso del presente estudio, ya que a las 7 h (cuando se observa la mayor estimulación de la expresión de PPAR y ACO) no se observaban diferencias en las concentraciones de FFA entre las ratas controles y las tratadas. Así pues, la estimulación a las 7 h de la administración de la expresión del PPAR y de su gen diana, ACO, por la lovastatina, podría estar originando un catabolismo aumentado de los FFA en el hígado, que diera cuenta del efecto hipotrigliceridemiante tardío provocado por dicha estatina.

Por otra parte, en estudios previos[22], habíamos encontrado que la expresión hepática de PEPCK se correlacionaba con la de PPAR, respondiendo de manera similar a factores plasmáticos tales como FFA e insulina. Sin embargo, en el presente estudio pudimos observar que, a diferencia de lo encontrado para el PPARα, la expresión de PEPCK parecía estar más influida por la concentración de los FFA en plasma que por el fármaco. Así, el aumento de su expresión, observado ya a las 3 h de recibir el fármaco, podría ser un reflejo del rápido aumento que también se producía en la concentración de los FFA plasmáticos de las ratas sometidas a lovastatina. Posteriormente, dado que las concentraciones de FFA llegaban a igualarse en los dos grupos, la expresión de dicha enzima, también. De hecho, nosotros hemos observado en ratas adultas que la expresión hepática de PEPCK responde de manera muy sensible a variaciones en la concentración de FFA en plasma (Panadero, Herrera y Bocos, datos sin publicar).

Otro punto de regulación de la trigliceridemia es la liberación por el tejido adiposo de los productos de su lipólisis (FFA y glicerol), los cuales una vez captados por el hígado pueden ser utilizados preferentemente para la formación de lipoproteínas ricas en triglicéridos. De hecho, la acción hipotrigliceridemiante de diversos fármacos, tales como ácido nicotínico y fibratos, se ha explicado en parte como un efecto inhibidor de esas sustancias sobre la lipólisis del tejido adiposo[23,24]. Así, en el presente estudio, se determinó la actividad lipolítica basal del tejido adiposo, encontrándose que a las 7 h de la administración, la lovastatina reducía significativamente dicho parámetro. Este efecto, claramente antilipolítico de la lovastatina, podría estar influyendo en la acción hipotrigliceridemiante que el fármaco ejercía precisamente a ese tiempo del estudio. Por otro lado, en el grupo de ratas control a lo largo de todo el estudio, así como en el grupo de tratadas a los tiempos de 1,5 y 3 h, se observaba un paralelismo entre la actividad lipolítica del tejido adiposo (medido como lipólisis basal) y las concentraciones plasmáticas de sus productos (FFA y glicerol), que aumentaban a lo largo del experimento. Este hecho posiblemente fuera debido a que las ratas, como animales nocturnos que son, se iban encontrando en un progresivo ayuno durante la etapa diurna en la que se desarrolló el estudio[25]. Así, es bien sabido que durante el período diurno, en las ratas estaría disminuyendo progresivamente la insulinemia (factor antilipolítico) y aumentando, por el contrario, las concentraciones de adrenalina y glucocorticoides[26] (factores prolipolíticos), lo que conllevaría un incremento paulatino de la lipólisis del tejido adiposo[27,28]. Sin embargo, el claro efecto antilipolítico del fármaco, que se había encontrado a las 7 h de la administración, no se veía reflejado en las concentraciones plasmáticas de glicerol y FFA en ese tiempo del estudio. Ello podría deberse a una menor utilización por el hígado de esos productos de la lipólisis para la formación de triglicéridos, dado que el fármaco estaría afectando las rutas metabólicas hepáticas implicadas en dicha síntesis, como aquí ya se ha comentado y han sugerido también otros[1,18]. De cualquier forma, este efecto antilipolítico de la lovastatina estaría en consonancia con los resultados descritos por otros autores[13], donde observaron que las estatinas mostraban una clara capacidad para reducir la concentración plasmática de FFA.

Una posible explicación para el efecto antilipolítico de la lovastatina aquí observado podría estar relacionada con la inhibición que la lovastati-

na pudiera estar ejerciendo sobre la síntesis de ubiquinona, descrita anteriormente en ratas[29,30]. Es sabido que este compuesto participa en la fosforilación oxidativa, por lo que una reducción en su contenido estaría comprometiendo la disponibilidad de ATP en la célula y, por ende, en los múltiples procesos de fosforilación/desfosforilación. Dado además que la forma activa de la HSL es la fosforilada, la lovastatina podría estar así bloqueando la tasa lipolítica del tejido adiposo. Curiosamente, sin embargo, cuando nos fijamos en cómo la lovastatina afectaba a los parámetros farmacocinéticos de la lipólisis, se pudo observar que previo a su citado efecto antilipolítico, dicho fármaco provocaba, al menos *ex vivo*, una disminución en la *EC50* para la adrenalina. Cambios en este parámetro se suelen asociar a variaciones ocurridas en la transmisión intracelular de la señal o en el funcionamiento de la HSL (a nivel de actividad, expresión o localización). Sin embargo, se pudo observar que, al menos la expresión de dicha enzima no era afectada por el tratamiento a ninguno de los tiempos estudiados (datos no mostrados). Por otro lado, se encontró que la respuesta máxima a la adrenalina en los animales controles disminuía con el transcurso del experimento, lo cual podría achacarse a un aumento con el tiempo en las concentraciones en plasma de esta hormona prolipolítica, lo que estaría ejerciendo una desensibilización homóloga del adipocito[31]. Sin embargo, en los animales tratados, esa menor respuesta a la adrenalina observada a las 3 h en las ratas controles no se daba. Ello podría deberse a que la lovastatina estuviera provocando una hipersensibilización de los adipocitos a la acción de dicha hormona. Aún más, esta posibilidad podría a su vez servir para dar una explicación al efecto antilipolítico posterior de la lovastatina, de manera que el fármaco en un primer momento estaría facilitando la acción de la adrenalina, lo que *a posteriori* estaría originando una desensibilización heteróloga del adipocito[32,33].

Son múltiples los puntos de control en los cuales la lovastatina podría estar afectando la actividad lipolítica del tejido adiposo y la actuación de otras moléculas sobre dicha vía (catecolaminas, glucocorticoides, etc.), tal como se ha podido comprobar para el caso de la insulina[34]. Así por ejemplo, se ha propuesto que la lovastatina inhibe la ruta de señalización de proteínas G pequeñas tales como Rho y la cascada de cinasas correspondiente (Rho cinasa, entre ellas)[11]. Y en ese sentido resulta curioso que, en el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides, se ha descrito que la lovastatina es capaz de revertir la acción de los glucocorticoides en el hueso, gracias a su acción inhibitoria precisamente sobre la ruta de la Rho cinasa[11,35]. Ya sea a través de dicha ruta o con la participación de otras cinasas, como pudiera ser la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK)[36] o incluso la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K)[34], la lovastatina podría estar comprometiendo la fosforilación de HSL y, por tanto, su actividad y actuar así de manera opuesta a como lo hacen glucocorticoides y catecolaminas.

Si realmente el efecto de la lovastatina sobre la actividad lipolítica del tejido adiposo está ocurriendo como una acción opuesta a los glucocorticoides, resultaría sorprendente su actuación como factor antilipolítico en tejido adiposo (efecto contrario al típico de los glucocorticoides) y, por el contrario, promoviendo la expresión hepática de PPAR y ACO (en el mismo sentido que el descrito para los glucocorticoides[26,37]). Ello podría estar sugiriendo que la acción de lovastatina sobre estas dos vías estaría ocurriendo a través de mecanismos diferentes en cada caso.

Según todo esto, el efecto hipotrigliceridemiante de la lovastatina en ratas normolipémicas podría deberse, por un lado, a un incremento de la expresión de PPAR y genes relacionados con el catabolismo de los FFA en el hígado tales como la ACO, y por otro a un efecto antilipolítico neto en el tejido adiposo. Así, el efecto hipotrigliceridemiante de las estatinas se asemejaría al mecanismo de acción propuesto para los fibratos o ligandos del PPARα. De hecho, se ha descrito que las estatinas pueden actuar a través de un elemento respuesta presente en el promotor de los genes diana que coincidiría con el del PPAR (PPRE)[11]. Todos estos efectos de la lovastatina aquí observados podrían reafirmar su utilidad en la terapia contra un amplio abánico de enfermedades, desde aquellas en las que interesa reducir tanto las concentraciones de colesterol como las de triglicéridos, como es el caso de la obesidad y la diabetes tipo 2, hasta aquellas en las que un control de la movilización aumentada de lípidos podría resultar beneficioso, tal como ocurre en la caquexia cancerosa[38,39] o en procesos inflamatorios[40].

Agradecimiento

Este estudio ha sido llevado a cabo gracias a la financiación proporcionada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/0524), Universidad San Pablo-CEU (10/01) y la Comunidad de Madrid (0023/00). Los autores agradecen a Jose M.ª Garrido su apoyo en el manejo de las ratas.

Bibliografía

1. Fujioka T, Tsujita Y. Effects of single administration of pravastatin sodium on hepatic cholesterol metabolism in rats. Eur J Pharmacol 1997;323:223-8.
2. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Fruchart J-C, Tailleux A, Fiévet C, Auwerx J. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. FEBS Lett 1999;452:160-4.
3. Mosley ST, Kalinowski SS, Schafer BL, Tanaka RD. Tissue-selective acute effects of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on cholesterol biosynthesis in lens. J Lipid Res 1989;30:1411-20.
4. Norman DJ, Illingworth DR, Munson J, Hosenpud J. Myolysis and acute renal failure in a heart-transplant recipient receiving lovastatin. N Engl J Med 1988;318:46-7.
5. Olbricht C, Wanner C, Eisenhauer T, Kliem V, Doll R, Boddaert M, et al. Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. Clin Pharmacol Ther 1997;62:311-21.
6. Anguita M, Alonso-Pulpon L, Arizon JM, Cavero MA, Valles F, Segovia J, et al. Comparison of the effectiveness of lovastatin therapy for hypercholesterolemia after heart transplantation between patients with and without pretransplant atherosclerotic coronary artery disease. Am J Cardiol 1994;74:776-9.
7. Martínez-Castelao A, Grinyo JM, Gil-Vernet S, Serón D, Castineiras MJ, Ramos R, et al. Lipid-lowering long-term effects of six different statins in hypercholesterolemic renal transplant patients under cyclosporine immunosuppression. Transplant Proc 2002;34:398-400.
8. Bocos C, Gottlicher M, Gearing K, Banner C, Enmark E, Teboul M, et al. Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). J Steroid Biochem Molec Biol 1995;53:467-73.
9. Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart J-C, Staels B. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. Atherosclerosis 1996;124:S29-S37.
10. Prasanna P, Thibault A, Liu L, Samid D. Lipid metabolism as a target for brain cancer therapy: synergistic activity of lovastatin and sodium phenylacetate against human glioma cells. J Neurochem 1996;66:710-6.
11. Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart J-C, et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARα and induces HDL apoA-I. J Clin Invest 2001;107:1423-32.
12. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S, et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1-beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. Life Sci 2000;67:863-76.
13. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. J Pharmacol Exp Ther 2002;302:232-9.
14. Garland PB, Randle PJ. A rapid enzymatic assay for glycerol. Nature 1962;196:987-8.
15. Somogyi M. Determination of blood sugar. J Biol Chem 1954;160: 69-73.
16. Inoue I, Noji S, Shen M, Takahashi K, Katayama S. The peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) level. Biochem Biophys Res Comm 1997;237:606-10.
17. Domínguez MC, Herrera E. The effect of glucose, insulin and adrenaline on glycerol metabolism "in vitro" in rat adipose tissue. Biochemistry 1976;158:183-90.
18. Krause BR, Newton RS. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. Atherosclerosis 1995;117:237-44.
19. Ditschuneit HH, Kuhn K, Ditschuneit H. Comparison of different HMG-CoA reductase inhibitors. Eur J Clin Pharmacol 1991;40:S27-S32.
20. Henwood JM, Heel RC. Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. Drugs 1988;36:429-54.
21. Panadero MI, Herrera E, Bocos C. Nutritionally induced changes in the peroxisome proliferator-activated receptor-α gene expression in liver of suckling rats are dependent on insulinaemia. Arch Biochem Biophys 2001;394:182-8.
22. Panadero MI, Herrera E, Bocos C. Peroxisome proliferator-activated receptor-α expression in rat liver during postnatal development. Biochimie 2000;82:723-6.
23. Bocos C, Castro M, Quack G, Herrera E. Studies with etofibrate in the rat. Part II: A comparison of the effects of prolonged and acute administration on plasma lipids, liver enzymes and adipose tissue lipolysis. Biochim Biophys Acta 1993;1168:340-7.
24. Bocos C, Herrera E. Comparative study on the in vivo and in vitro antilipolytic effects of etofibrate, nicotinic acid and clofibrate in the rat. Environ Toxicol Pharmacol 1996;2:351-7.
25. Le Magnen J. Lipogenesis, lipolysis and feeding rhythms. Ann Endocrinol (Paris) 1988;49:98-104.
26. Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene by glucocorticoids. J Biol Chem 1994;269:24527-30.
27. Danguir J, Nicolaidis S. Circadian sleep and feeding patterns in the rat: possible dependence on lipogenesis and lipolysis. Am J Physiol 1980;238:E223-E30.
28. Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, Macdonald IA, Matthews DR, Frayn KN. Effects of morning rise in cortisol concentration on regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. Am J Physiol 1996;271(6 Pt 1):E996-E1002.
29. Willis RA, Folkers K, Tucker JL, Ye CQ, Xia LJ, Tamagawa H. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:8928-30.
30. Marinari UM, Pronzato MA, Dapino D, Gazzo P, Traverso N, Cottalasso D, et al. Effects of simvastatin on liver and plasma levels of cholesterol, dolichol and ubiquinol in hypercholesterolemic rats. Ital J Biochem 1995;44:1-9.
31. Balkin MS, Sonenberg M. Hormone-induced homologous and heterologous desensitization in the rat adipocyte. Endocrinology 1981;109:1176-83.
32. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. J Lipid Res 1993;34: 1057-91.
33. Bousquet-Mélou A, Galitzky J, Muñoz Moreno C, Berlan M, Lafontan M. Desensitization of ß-adrenergic responses in adipocytes involves receptor subtypes and cAMP phosphodiesterase. Eur J Pharmacol 1995;289:235-47.
34. McGuire TF, Xu XQ, Corey SJ, Romero GG, Sebti SM. Lovastatin disrupts early events in insulin signaling: a potential mechanism of lovastatin's anti-mitogenic activity. Biochem Biophys Res Commun 1994;204:399-406.
35. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 2001;287:337-42.
36. Xu X, McGuire TF, Blaskovich MA, Sebti SM, Romero GG. Lovastatin inhibits the stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin in HIRcB fibroblasts. Arch Biochem Biophys 1996;326: 233-7.
37. Sorensen HN, Hvattum E, Paulssen EJ, Gautvik KM, Bremer J, Spydevold O. Induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase by 3-thia fatty acid, in hepatoma cells and hepatocytes in culture is modified by dexamethasone and insulin. Biochim Biophys Acta 1993;1171: 263-71.
38. Argilés JM, López Soriano FJ. Interrelaciones metabólicas entre el huésped y el tumor durante la fase perinatal. Med Clin (Barc) 1997;109:186-94.
39. Russell ST, Tisdale MJ. Effect of a tumour-derived lipid-mobilising factor on glucose and lipid metabolism in vivo. Br J Cancer 2002;87:580-4.
40. Faggiotto A, Paoletti R. Do pleiotropic effects of statins beyond lipid alterations exist in vivo? What are they and how do they differ between statins? Curr Atheroscler Rep 2000;2:20-5.