



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES EN EL METABOLISMO DEL
COLESTEROL EN LA RATA, INDUCIDAS
POR DERIVADOS DEL ACIDO VALERICO.

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G A
p r e s e n t a

MARIA JUANA TORRES JIMENEZ



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

179
2ej.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a pasante(s) _____

MARIA JUANA TORRES JIMENEZ.

con número de cuenta 63 - 13398 con el Título: _____

VARIACIONES EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN LA RATA, INDUCIDAS POR

DERIVADOS DEL ACIDO VALERICO.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	DR. JUAN CUAUHTEMOC DIAZ ZAGOYA		
Director de Tesis	DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA		
	DR. RENE CARDENAS VAZQUEZ		
	DR. JAIME MARTINEZ MEDELLIN		
Suplente	DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES		
Suplente			

**Tesis realizada bajo la dirección del
Dr. Juan C. Díaz Zagoya, del Departamento
de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.**

AGRADECIMIENTOS

A LOS HONORABLES MIEMBROS DE MI JURADO:

DR. JUAN CUAUTHEMOC DIAZ ZAGOYA

DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA

DR. RENE CARDENAS VAZQUEZ

DR. JAIME MARTINEZ MEDELLIN

DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES

Ni infinita gratitud al Dr. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya, por su valiosa ayuda y por todo el apoyo que siempre me brindó. Sin su dirección y aportaciones, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza, por sus constantes enseñanzas, correcciones y la infinita paciencia que siempre me expresó.

Por sus cuidadosas correcciones que mejoraron este trabajo:

El Dr. René Cárdenas Vázquez

El Dr. Jaime Martínez Medellín

El Dr. Jesús Manuel León Cázares.

A la Dra. Arcelia de la Roz Peña por sus valiosas observaciones y ayuda.

A MIS HIJOS:

ITANDEHUITL

NAGELY

CUAUTEMOC

Por ser ustedes el motivo de mi realización,
por su amor y por ser hijos ejemplares en la
lucha por la superación.

CONTENIDO:**Páginas**

Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
Introducción.....	4
La búsqueda de nuevos fármacos en la década de los 1970.....	6
Las vastatinas (estatinas).....	8
Los derivados de la cadena lateral de la diosgenina.....	14
Aterosclerosis-Trombosis.....	14
Metabolismo del Colesterol.....	17
Digestión y absorción.....	18
La síntesis del colesterol.....	20
Los pasos enzimáticos de la colesteroogénesis.....	23
Trastornos en el metabolismo del colesterol.....	29
Biosíntesis de ácidos biliares.....	30
Las Lipoproteínas.....	32
Parte Experimental de la Tesis	56
Hipótesis de Trabajo.....	56
Materiales y métodos.....	57
Compuestos probados: MPS y HMVA.....	57
Animales	
Reactivos marcados	
Medición de la colesteroogénesis.....	58
In Vitro	
In Vivo	
Evaluación de la colesteroogénesis en el SNC.....	70
Extracción del colesterol.....	71
Resultados.....	72
Discusión.....	75
Efecto del HMVA y del MPS sobre la colesteroogénesis.....	75
in Vivo	
In Vitro	
Conclusiones.....	82
Referencias.....	83

RESUMEN

Se estudió el efecto hipocolesterolemiante de las sales sódicas del ácido 4-metil-5-hidroxisovalérico (HMVA) y del ácido 4-metil-4-pentenoico (MPS) en la rata tratando de averiguar si éste es por inhibición de la HMG-CoA reductasa.

El HMVA, *in vitro* inhibió la incorporación de acetato y mevalonato a colesterol, siendo el efecto mayor sobre la incorporación de acetato. *In vivo*, administrado subcutáneamente, no tuvo efectos sobre la biosíntesis del colesterol. En cambio, administrado oralmente, inhibió 60% la incorporación de acetato y 30% la de mevalonato a colesterol en el hígado, pero no hubo cambios en el contenido de colesterol. Tampoco se modificó la actividad de la HMG-CoA reductasa.

El MPS inhibió *in vitro* la incorporación de acetato y mevalonato a colesterol en hígado, en todas las dosis probadas. *In vivo*, cuando se administró por vía subcutánea, produjo estimulación de la incorporación de ambos precursores. En suero se observó un efecto hipocolesterolemiante con las distintas dosis empleadas. También hubo disminución de los triacilglicérols plasmáticos. Además, se observó un incremento de la incorporación de mevalonato a colesterol en el cerebelo y una disminución de la incorporación de mevalonato a colesterol en el hipotálamo.

Ni para HMVA ni para MPS, el efecto hipocolesterolemiante observado, puede ser explicado por acción inhibitoria sobre la enzima marcapaso de la biosíntesis del colesterol.

ABREVIATURAS

- ACAT - Acil Coenzima A: Colesterol-O-Acil Transferasa
- ApoA - Apoproteína A
- ApoB - Apoproteína B
- ApoE - Apoproteína E
- B - Cerebro
- C - Cerebelo
- CE - Colesterol esterificado
- CHD - Enfermedad Cardíaca de las Coronarias
- C-HDL - Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
- C-LDL - Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
- CNE - Colesterol no esterificado
- CoASH - Coenzima A
- CoQ - Coenzima Q
- COX - Ciclooxygenasa
- C-VLDL - Colesterol de Lipoproteínas de Muy baja Densidad
- DAG - Diacilglicerol
- dpm - Desintegraciones por minuto
- FGF - Factor de crecimiento de fibroblastos
- GM-CSF - Factor estimulante de colonias para granulocito y monocito
- H - Hipotálamo
- HDL - Lipoproteínas de alta densidad
- HF - Hipercolesterolemia familiar
- HMG-CoA reductasa - Hidroxi metil Glutaril coenzima A reductasa
- HMG-CoA - Hidroxi metil glutaril coenzima A
- HMVA - Sal sódica del ácido 4-metil-5-hidroxivalérico

IDL - Lipoproteínas de Densidad Intermedia
IFN - alfa - Interferón alfa
IL-1 - Interleucina 1
LDL- Lipoproteína de baja densidad
LCAT - Lecitina Colesterol Aciltransferasa
LOX - Lipooxigenasa
Lp - Lipoproteína
Lp(a) - Lipoproteína a
LT - Leucotrieno
LX - Lipoxinas
MEV - Mevalonato
MPS - Sal sódica del ácido 4-metil-4-pentenoico
PDGF - Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG - Prostaglandinas
PGI₂ - Prostaciclina
PGD₂ - Prostaglandina D dos
PGE₂ - Prostaglandina E dos
PDGF - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
QM - Quilomicrones
sf - Unidades Svedverg de flotación
SNC - Sistema nervioso central
TAG - triacilgliceroles
TGFB - Factor de crecimiento transformante B
TNF - Factor de necrosis tumoral
TX - Tromboxanos
VLDL - Lipoproteínas de muy baja densidad

INTRODUCCION

LOS AGENTES HIPOCOLESTEROLEMIANTES ANTES DE LA DECADA DE 1970.

Durante las décadas de 1950 y 1960, se reportaron y fueron introducidos al uso clínico distintos agentes hipolipemiantes, entre ellos los siguientes: ácido nicotínico, colestiramina, clofibrato, neomicina, esteroides vegetales, triparanol, D-tiroxina y estrógenos.

De estos fármacos, el ácido nicotínico¹ reduce el colesterol y los triacilglicéridos, sobre todo estos últimos, disminuyendo la síntesis de lipoproteínas y el C-LDL. Sin embargo presenta algunos efectos colaterales indeseables como son vasodilatación cutánea, lesiones de piel, hiperuricemia, hiperglucemia y trastornos intestinales.

La colestiramina², una resina de intercambio iónico, actúa atrapando ácidos biliares en el lumen intestinal, interfiriendo así en su reabsorción y consecuentemente aumentando su excreción fecal. Como respuesta secundaria a este efecto la síntesis endógena de ácidos biliares se incrementa de manera importante, lo que conduce a un incremento de los requerimientos de colesterol en el hígado y a su vez lleva a un incremento de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa.

La colestiramina es efectiva en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia pero, desafortunadamente, se requieren dosis altas y no es bien tolerada por todos los pacientes. Por lo tanto, no obstante su utilidad, los secuestrantes de ácidos biliares no

son los agentes ideales en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

El clofibrato³ y sus derivados son agentes hipolipemiantes comunmente utilizados. Su efecto principal es la reducción del C-VLDL, lo que hace que la hipercolesterolemia sea muy moderada. Este fármaco tiene acciones diversas, incluyendo la estimulación de la lipólisis por aumento en la actividad de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo. Otras acciones a nivel bioquímico no están identificadas plenamente.

La neomicina⁴ es un agente hipolipemiente efectivo en el tratamiento de los pacientes con hipercolesterolemia familiar. Actúa precipitando el colesterol en el tracto gastrointestinal e inhibiendo en esta forma su absorción a nivel del aparato digestivo. Los efectos colaterales tales como las náuseas y la diarrea hacen limitada su administración.

Los esteroides de plantas, que interfieren con la absorción del colesterol en el tracto intestinal⁵, no tienen efecto sobre el C-VLDL y su acción sobre el C-LDL es variable. No todos los esteroides han sido probados en la clínica y se desconocen sus efectos tóxicos cuando se administran por períodos prolongados. Además existen datos de que algunos de ellos se absorben en un porcentaje importante y se acumulan en algunos tejidos como ciertas partes del SNC⁶.

El triparanol⁷ compuesto conocido como (Mer 29) es efectivo en la reducción del colesterol del suero. Este compuesto inhibe la colesterogénesis en una de sus etapas finales, produciendo la

acumulación de los intermediarios de la última parte de la vía. En vista de que dentro de sus efectos colaterales produce cataratas, fue eliminado del mercado.

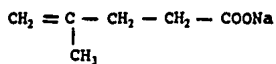
La D-tiroxina¹, el isómero óptico de la L-tiroxina, disminuye efectivamente el C-LDL tanto en pacientes con función tiroidea normal como en hipotiroideos. Su empleo por períodos prolongados, en hombres con enfermedad isquémica de las coronarias, provoca aumento de la mortalidad por arritmias, angina de pecho e infartos múltiples.

Los estrógenos² han sido empleados en el tratamiento de la hiperlipidemia, sin embargo no son recomendables como agentes hipolipemiantes en los varones, por sus efectos feminizantes y porque producen elevación de las VLDL y de los TAG.

LA BUSQUEDA DE NUEVOS FARMACOS EN LA DECADA DE 1970.

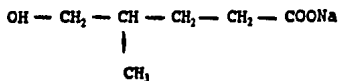
Dado que ninguno de los fármacos disponibles antes de los años de 1970 podía ser considerado como un agente ideal para el control de la hipercolesterolemia, se prosiguió con la búsqueda de nuevos compuestos. Se tenía la certeza de que se podrían encontrar fármacos efectivos en el tratamiento de las hiperlipidemias, sobre todo si éstos produjeran inhibición de la HMG-CoA reductasa, enzima reguladora de la vía de biosíntesis del colesterol.

En la búsqueda de nuevos fármacos hipocolesterolemiantes, uno de los enfoques fue el probar análogos estructurales del



Sal sódica del ácido 4-metil-4-pentenoico

(M P S)



Sal sódica del ácido 4-metil-5-hidroxi-valérico

(H M V A)

**FIGURA 1. COMPUESTOS DERIVADOS DEL ACIDO VALERICO QUE HAN SIDO
PROBADOS COMO AGENTES HIPOLIPEMIANTE EN NUESTRO LABORATORIO**

intermediario en la transformación de HMG-CoA a mevalonato (fig 1). En los años en que la industria farmacéutica utilizó a la diosgenina, para la obtención de pregnenolona y otras hormonas, en el proceso de transformación se eliminaban 6 carbonos de la diosgenina, mismos que podrían tener estructuras diversas. Giral y colaboradores (Facultad de Química, UNAM) aislaron, purificaron e identificaron algunos de estos productos colaterales de 6 carbonos. En nuestro laboratorio probamos varios de estos análogos del mevalonato, como posibles agentes hipocolesterolemiantes.

Endo y Kuroda¹⁰ iniciaron, la búsqueda de este tipo de inhibidores en cultivos de microorganismos, buscando sustancias producidas por dichos cultivos que inhibieran la incorporación del acetato-1-¹⁴C y mevalonato-2-³H a los lípidos no saponificables de otros microorganismos que requieren esteroides para su crecimiento. En los casos en que no se encontró inhibición de la incorporación de mevalonato pero sí en la incorporación de acetato a los lípidos no saponificables, se supuso la existencia de un inhibidor que actúa en alguno de los pasos iniciales de la colesterogénesis, muy probablemente sobre el catalizado por la HMG-CoA reductasa. Después de probar miles de cepas microbianas, se encontró que la citrinina, producida por *Pythium ultimum* inhibía irreversiblemente la HMG-CoA reductasa¹¹. Posteriormente se aislaron otros compuestos, entre ellos la mevastatina.

La parte experimental de esta tesis informa sobre los resultados obtenidos al probar diversos compuestos análogos del mevalonato, todos ellos aislados como productos colaterales en la

síntesis química de pregnenolona a partir de diosgenina (fig 2). Comúnmente estos productos colaterales son desechados en el proceso industrial. La semejanza de algunos de ellos con la estructura molecular del intermediario, en la transformación de la HMG-CoA a mevalonato (fig 3) los hace candidatos a ser inhibidores de la enzima catalizadora. Los resultados al probar algunos de ellos ya han sido publicados¹².

LAS VASTATINAS (ESTATINAS)

Por varias décadas, los estudios clínicos se han dirigido a contestar la pregunta: ¿el tratamiento de la hiperlipidemia reduce el riesgo asociado de fenómenos cardiovasculares? Existen evidencias que apoyan la idea de que los beneficios cardiovasculares están relacionados al grado de reducción del C-LDL y posiblemente al grado de aumento del C-HDL.

Otra pregunta relacionada es: ¿la progresión de la aterosclerosis puede ser retardada o revertida por el tratamiento?

En la búsqueda de inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa, diversos compuestos han sido aislados de metabolitos de hongos o bien obtenidos por procesos de síntesis. El primero de éstos, utilizado en el humano, fue la mevastatina, anteriormente denominada compactina. Endo aisló la compactina de un cultivo de Penicillium citrinum¹⁰. Aunque este fármaco fue efectivo para reducir el C-LDL, su empleo en las investigaciones clínicas se suspendió debido a los efectos adversos detectados en estudios toxicológicos. El segundo inhibidor utilizado fue la lovastatina¹³.

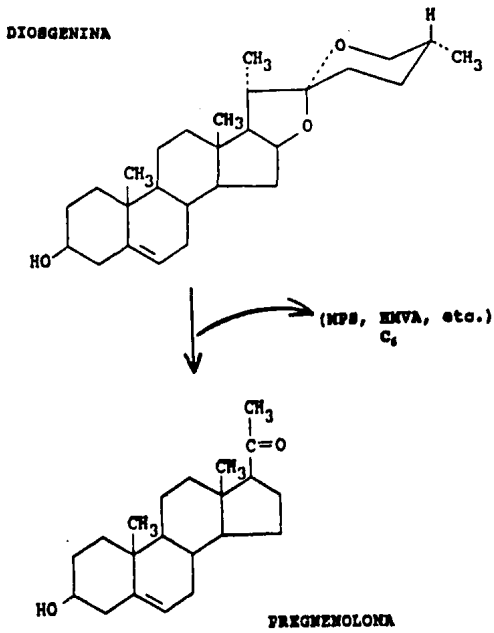


FIGURA 2. Reacción de síntesis de pregnenolona a partir de diosgenina. Se sintetizan diversos productos colaterales constituidos de seis carbonos entre éstos, se aislaron y purificaron los compuestos MPS y EMVA con los que experimentamos en nuestro laboratorio.

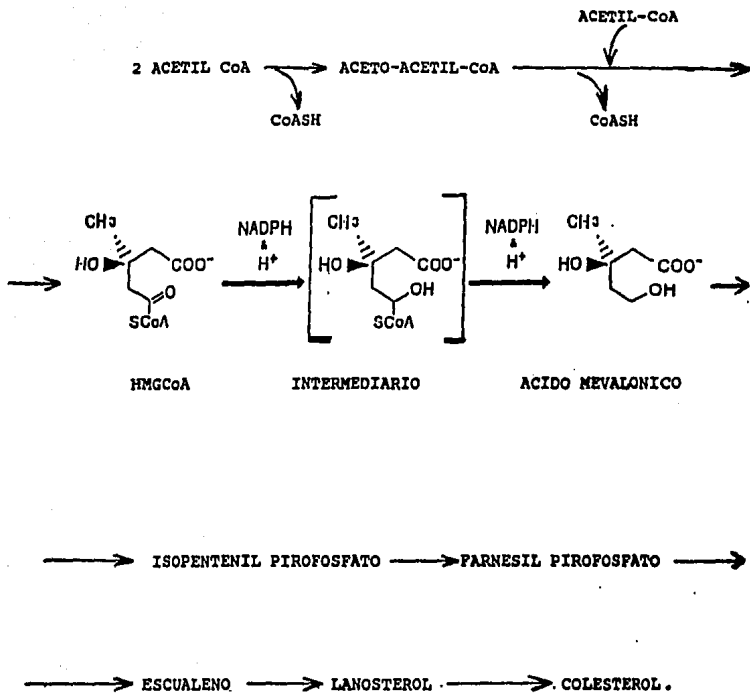
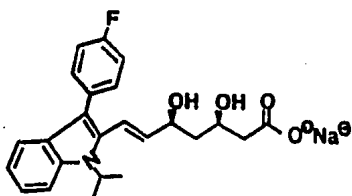
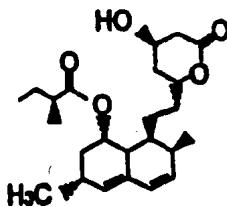


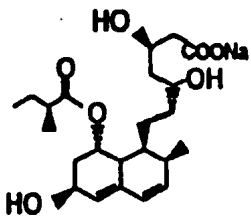
FIGURA 3. PASO ENZIMATICO EN QUE ES REGULADA LA COLESTEROGENESIS.



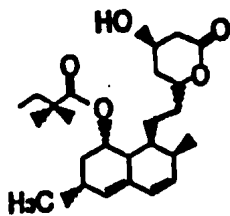
Fluvastatina



Lovastatina



Pravastatina



Simvastatina

FIGURA 4. LAS VASTATINAS (ESTATINAS)

En el caso de las vastatinas (fig 4), el mecanismo primario de la disminución del colesterol es la inhibición de la biosíntesis de novo del mismo, lo cual agota el colesterol intracelular, aumentando también la síntesis de proteína de los receptores de LDL y su actividad, con la subsecuente disminución de los niveles de LDL en el plasma. *In vivo* la compactina es efectiva para disminuir los niveles de colesterol en plasma del perro, mono, gallina, conejo¹⁴, pero no es efectiva en rata, ratón y hámster¹⁴. Esta droga también es eficaz en el humano. Igualmente hay datos obtenidos en el cerdo que indican que inhibe la síntesis hepática de apo B-100¹⁴.

El incremento del colesterol total plasmático y del C-LDL está asociado con un mayor riesgo de CHD. Por otro lado, la disminución de las concentraciones de C-HDL parece constituir un riesgo adicional. La disminución del C-LDL puede reducir significativamente la incidencia de CHD, retardar el progreso y promover la regresión de las placas ateroscleróticas en las coronarias nativas y en los injertos venosos de las arteriotomías (*bypass*)¹⁵. Brown y colaboradores¹⁶ demostraron recientemente, en varones con CHD, que la reducción de C-LDL y de Apo-B y la elevación de C-HDL y apo A-I disminuyeron la progresión de las lesiones de coronarias, aumentaron la frecuencia de la regresión y redujeron la incidencia de los fenómenos cardiovasculares. Si en un hombre de edad media con hipercolesterolemia primaria se disminuyen los niveles de C-LDL, esto da como resultado menos infartos y menos muertes por trastornos coronarios.

La aterosclerosis es una enfermedad común y causa la mayoría

de las muertes en el mundo occidental. La enfermedad aterosclerótica comienza en edades tempranas, quizá desde el primer año de vida, con la formación de las estrias grasosas. En los adolescentes y adultos jóvenes pueden encontrarse ya estrias grasosas en las paredes arteriales, acelerándose el proceso de aterosclerosis por la hipercolesterolemia.

La pravastatina es un potente inhibidor de la HMG-CoA reductasa¹⁷. Fue descubierta como un metabolito menor de la mevastatina y más tarde fue producida por transformación microbiana de la mevastatina empleando Nocardia autotrófica.

La compactina y la lovastatina tienen ligero parecido a la HMG-CoA y muestran aproximadamente diez mil veces mayor afinidad por la HMG-CoA reductasa que el sustrato de ésta, la HMG-CoA. Por lo tanto, es probable que los mecanismos de acción de estos compuestos sea una inhibición competitiva de la enzima. La pravastatina reduce preferentemente la HMG-CoA reductasa hepática y disminuye la síntesis *de novo* del colesterol en el hígado. Esta acción disminuye la concentración intracelular del colesterol y produce un aumento compensatorio en la síntesis de la proteína del receptor de las LDL. Esto da como resultado el aumento concomitante del catabolismo de las LDL, mediado por el receptor.

En estudios toxicológicos en perros, la simvastatina, a dosis 50 veces la dosis terapéutica máxima, produjo aumento en la frecuencia de cataratas¹⁸.

La apoB, el componente estructural mayor de las LDL y las VLDL, no se recambia entre las lipoproteínas y por lo tanto es un

marcador útil para estudiar el metabolismo de éstas. Además, la apoB es el determinante para el catabolismo de las LDL mediado por receptores. En el hombre normal, la apoB secretada por el hígado, con las VLDL ricas en TAG, es convertida secuencialmente en IDL y luego en LDL. En los sujetos normolipémicos, toda la apoB de LDL es derivada del catabolismo de las VLDL e IDL.

La combinación de mevinolina y colestiramina produce una mayor inhibición de la síntesis directa de la apoB de las LDL. El tamaño de la poza de las apoB de las LDL fue reducido en 60% debido a la disminución de la síntesis primaria y el otro 40% de la disminución del tamaño de la poza se debió a un incremento en la velocidad de remoción.

Estructuralmente la simvastatina es muy similar a la lovastatina¹³, excepto por la presencia de un grupo metilo adicional en la cadena lateral éster y es más potente que la lovastatina. La simvastatina se administra como una lactona que es hidrolizada primariamente en el hígado a la forma β hidroxilácido, activa biológicamente. La lactona parece ser más específica para el hígado, puesto que se retiene en mayor grado en este órgano donde se convierte a varios metabolitos activos e inactivos. Menos del 5% de la simvastatina administrada se encuentra en la circulación sistémica y un 0.5% se ha recuperado en la orina.

La simvastatina en dosis terapéuticas ha sido eficaz en el tratamiento de la hipercolesterolemia primaria, produciendo marcadas reducciones en el colesterol total y las C-LDL. Las reducciones promedio del colesterol total y de las C-LDL han sido

de 21 a 33% y de 24 a 40%, respectivamente, lo cual se acompaña de un aumento promedio del C-HDL de 8 a 13%. Este resultado se obtiene utilizando una dosis única diaria de 10 a 40 mg.

En un estudio de 349 pacientes ancianos, la incidencia de alteraciones clínicas o de laboratorio, como consecuencia de la administración de simvastatina, no fue diferente a la de pacientes con menos edad¹⁸.

El mevalonato (MEV), que se forma por la HMG-CoA reductasa, es esencial para la síntesis de diversos compuestos isoprenoides, así como para la colesterogénesis (fig 5). Uno de estos compuestos es la cadena lateral de la CoQ, la cual es un componente del sistema de transporte de electrones para la fosforilación oxidativa acoplada, en la membrana mitocondrial interna. Por lo tanto, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa podría reducir tanto los productos esteroides como los no esteroides del MEV. Los niveles séricos de ubiquinona-10 no se modificaron, concluyéndose que la compactina es efectiva para disminuir los niveles de colesterol en suero sin modificar los niveles de ubiquinona-10 en el suero de los paciente con HF heterociga. Se señala de cualquier modo que cuando uno utiliza una droga que inhibe la biosíntesis del colesterol, a nivel de la HMG-CoA reductasa, debe poner atención en los productos no esteroides del MEV, para cuidar que no se afecten éstos en su biosíntesis¹⁹.

La arteriografía cuantitativa¹⁶ es un método efectivo para la valoración directa del proceso vascular que lleva a trastornos clínicos y es prácticamente el único procedimiento de estudio de la

LA COLESTEROGENESIS

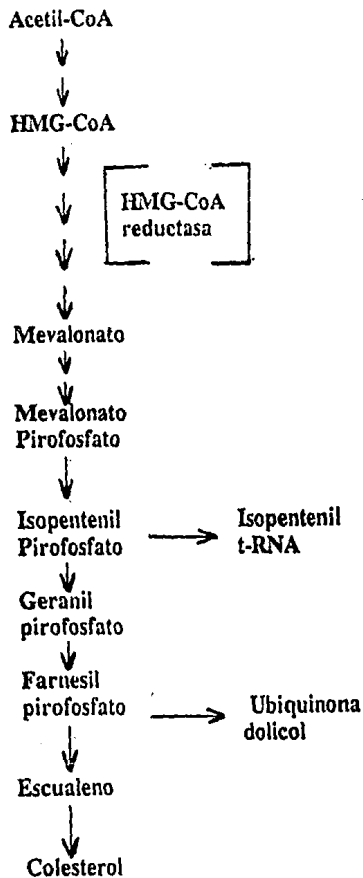


FIGURA 5. EL MEVALONATO ES ESENCIAL PARA LA SINTESIS DE ISOPRENOIDES.

regresión de las lesiones. Otro método no invasivo que se está aplicando actualmente es el ultrasonido de las arterias carótidas²⁰. La ultrasonografía es un procedimiento aplicable a poblaciones grandes con costos menores que otros procedimientos.

En otro estudio en el que se midió el efecto de la mevinolina sobre la esterificación del colesterol en el intestino, se tomó en cuenta que el colesterol dietario es absorbido en la forma libre y se secreta en forma esterificada como quilomicrones en los vasos linfáticos. La esterificación del colesterol en el enterocito es mediada sobre todo por la enzima ACAT, aunque la colesterol esterasa también podría estar participando¹¹.

Los microsomas de intestino se incubaron con concentraciones crecientes de mevinolina (0 a 100 $\mu\text{g/ml}$), observándose a concentraciones de 20 μg o mayores una inhibición importante de la ACAT. La dosis que inhibió 50% de la actividad enzimática fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM). La máxima inhibición se obtuvo con 100 $\mu\text{g/ml}$; la inhibición era muy probablemente de tipo competitivo.

El estudio de la aterosclerosis disminuyendo el colesterol ha demostrado que la disminución agresiva de los niveles de C-LDL y el aumento concomitante de C-HDL ha producido un beneficio significativo tanto en las arterias coronarias nativas como en el material injertado en arteriotomías (*bypass*). El deterioro de las coronarias fue reducido significativamente en los sujetos tratados con vastatinas solas o combinadas, comparativamente con los que recibieron el placebo y la regresión de la aterosclerosis, indicada por la mejoría perceptible del estado general de las coronarias,

ocurrió en el 16% de los sujetos tratados³⁷.

LOS DERIVADOS DE LA CADENA LATERAL DE LA DIOSGENINA.

En esta tesis se informa, por un lado, sobre el panorama general de la búsqueda de fármacos hipocolesterolemiantes en el último cuarto de siglo y por otro lado, sobre los resultados al estudiar algunos compuestos derivados de la cadena lateral de la diosgenina, mismos que fueron probados en experimentos *in vitro* e *in vivo* en la rata.

Los derivados de la cadena lateral de la diosgenina que se probaron como posibles agentes hipocolesterolémicos son las sales sódicas del ácido 4-metil-4-pentenoico (MPS) y del 4-metil-5-hidroxisalicílico (HMVA) (fig 1).

ATEROSCLEROSIS-TROMBOSIS

La aterosclerosis es un proceso de enfermedad progresiva que se produce en las arterias grandes y medianas. Las lesiones avanzadas contienen células lisadas, cristales de CE, células espumosas cargadas de lípidos, células musculares lisas, macrófagos y linfocitos T. La presencia de ateromas produce una mayor susceptibilidad a la trombosis²¹.

La adherencia plaquetaria, la activación y la liberación de agonistas, incluyendo los factores de crecimiento, son fenómenos que incitan la trombosis, fenómeno terminal de la aterosclerosis no tratada. Es evidente, entonces que la aterosclerosis y la trombosis son asuntos paralelos que deben ser estudiados juntos, para

comprender los aspectos básicos de la patología y del desarrollo de los procedimientos terapéuticos.

Las células que participan en la respuesta inflamatoria de placas ateroscleróticas en evolución y los trombos que se forman como una complicación, están reaccionando no sólo con los componentes de la lesión sino entre ellos mismos. Esto es en la forma de interacciones metabólicas y funcionales célula-célula, así como en una subdivisión de este proceso conocido como metabolismo transcelular. Los productos metabólicos con actividad biológica que se originan, de una variedad de células que interactúan, con potencialidad para promover la trombo-aterosclerosis e inducir alteraciones en el metabolismo lipídico, incluyen eicosanoides, factores de crecimiento y citocinas²¹.

La interacción de células inflamatorias, tales como los neutrófilos y macrófagos, con células endoteliales activadas por citocinas, constituye un mecanismo por el cual los mediadores solubles alteran el metabolismo del colesterol en las células musculares lisas y en los macrófagos.

El metabolismo transcelular de los eicosanoides puede ocurrir cuando estas células están muy próximas entre sí.

Los eicosanoides derivados de la lipooxigenasa o de la ciclooxigenasa participan en la regulación de procesos que conducen a la acumulación de lípidos en la pared del vaso después de la activación o lesión de la célula endotelial.

El papel de cada citocina y factor de crecimiento en la respuesta aterogénica a la lesión es muy complejo. Algunos de estos

modificadores de respuesta biológicos parecen ser proateroscleróticos. En ellos se incluye: PDGF, FGF, IL-1, TGF β , TNF, IFN-alfa y GM-CSF.

Los eicosanoides sintetizados por la pared de los vasos normales en respuesta a la estimulación humoral, actúan al antagonizar la influencia de los factores pro-aterogénicos, y en cierto grado media la influencia de los factores antiaterogénicos manteniendo el endotelio en un estado latente. Esto se manifiesta como una superficie no trombótica, no adhesiva, que mantiene un grado bajo de permeabilidad a las macromoléculas que están en circulación. Ejemplos de estos tipos de eicosanoides son: PGI $_2$, PGD $_2$ y PGE $_2$, tres metabolitos mayores de la ciclooxigenasa producidos por el lecho vascular. Esto está en contraste con los HETES y leucotrienos, incluyendo LTB $_4$ y LTC $_4$, que tienen propiedades pro-aterogénicas.

Los eicosanoides derivados de las células endoteliales han sido relacionados en los procesos de proliferación celular, adhesión celular, permeabilidad, migración, quimiotaxis, cambios fenotípicos y la regulación del metabolismo de esteroides. En los macrófagos, los eicosanoides derivados a través de las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa pueden influenciar el metabolismo del colesterol en una forma similar a como lo hacen en las células musculares lisas.

Es innegable que los factores humorales liberados durante la inflamación pueden afectar el metabolismo del colesterol en las células arteriales durante la aterosclerosis. Los eicosanoides y

las citocinas liberados de una célula pueden activar los receptores correspondientes de las células vecinas.

La identificación de estos caminos diversos, asociados con las señales transmembrana, ha ayudado a definir procesos relacionados a la trombosis pues comparten vías comunes en una arteriopatía compleja durante la aterosclerosis.

Si la terapéutica tanto para la aterosclerosis como para la trombosis no es tan satisfactoria como debería ser, esto significa que la patogénesis no está clara y que es necesario continuar la búsqueda de fármacos que tengan utilidad al modificar en una forma deseable una o más partes de esta compleja enfermedad progresiva.

METABOLISMO DEL COLESTEROL

El metabolismo del colesterol ha sido muy estudiado^{22,23} en gran parte debido a que los trastornos del mismo parecen tener una relación directa con la patología humana en diversas situaciones, como son algunos tipos de hiperlipidemia, enfermedades de las vías biliares, xantomatosis, enfermedad coronaria, etc.

El colesterol es el principal esteroide del organismo humano. Corresponde al 0.2% del peso corporal, 140 g para un sujeto de 70 kg. Las células pueden sintetizarlo a partir de acetato o bien recibirlo de fuentes exógenas.

La regulación del metabolismo del colesterol se ejerce en las enzimas que participan en su síntesis, esterificación y catabolismo.

El colesterol sanguíneo es fácilmente medible y su valoración es

utilizada como un indicador del estado que guarda la llamada poza de colesterol altamente recambiable. Existen otras pozas de recambio más lento y que no son fácilmente medibles.

El colesterol es una molécula lipídica presente en todos los animales. Los vegetales contienen otros esteroides, tales como el β -sitosterol, la diosgenina y el estigmasterol. En los animales el colesterol está distribuido principalmente en el sistema nervioso central, tejido adiposo, músculo y piel.

El CNE es un componente estructural de las membranas en las que actúa como regulador de la fluidez membranar. El CE no existe en las membranas, se encuentra en el citoplasma asociado a otros lípidos y su función parece ser la de reserva, depositándose principalmente en el tejido adiposo, hepático, gónadas y corteza suprarrenal.

El colesterol es tanto el producto de una vía biosintética, como el precursor de otras vías metabólicas como es el caso de la síntesis de ácidos biliares, de hormonas esteroideas y de vitamina D₃. La formación de ácidos biliares constituye el principal producto metabólico, si consideramos la cantidad.

Digestión y absorción.

El hombre puede absorber fácilmente el colesterol contenido en los alimentos. Una persona cuya dieta incluye leche, carne y huevos, ingiere en promedio entre 500 y 1,000 mg de colesterol por día (1.3 a 2.6 mmol), ya que su contenido en la yema de huevo es aproximadamente de 240 mg y la ingesta promedio de carne

proporciona entre 300 a 400 mg de colesterol. Sin embargo, del colesterol total ingerido, solamente se absorbe el 40%. Cuando la ingestión es relativamente baja, su absorción es eficiente; en cambio cuando el colesterol de la dieta excede los 800 mg (2.1 mmol/día), su absorción es menos eficiente.

Cuando una persona evita ingerir alimentos ricos en colesterol, resulta relativamente fácil reducir la ingesta de 400 a 500 mg/día; sin embargo, aún en estas condiciones, se absorben en promedio entre 200 a 300 mg (0.5 a 0.8 mmol/día).

Como ya se mencionó, el colesterol se encuentra sobre todo en los alimentos de origen animal; algunos esteroides, como el β -sitosterol, contenidos en alimentos vegetales, se absorben pobremente.

El colesterol de la dieta es incorporado a micelas formadas por constituyentes anfifílicos presentes en la bilis. Estas micelas contienen fosfolípidos y ácidos biliares conjugados, además del propio colesterol; este proceso, conocido como emulsificación, es indispensable para solubilizar el colesterol en el quimo, el medio acuoso presente en el lumen intestinal. El CE, una vez integrado en la fase micelar, es hidrolizado en el lumen por la enzima colesterol esterasa, presente en el jugo pancreático; esta hidrólisis es posible gracias al proceso de emulsificación, lo que permite que la enzima actúe sobre o dentro de la micela. El colesterol se absorbe por difusión de las micelas hacia las células de la mucosa, en donde gran parte de él es nuevamente esterificado.

Los ésteres de colesterol que se sintetizan en las células de

la mucosa intestinal, conjuntamente con el CNE, son incorporados a partículas de gran tamaño, constituidas principalmente por TAG; estas partículas, conocidas como QM, transportan el colesterol y los triacilgliceroles de la linfa hacia el plasma, a través del conducto torácico.

La síntesis del colesterol.

Cualquier célula de nuestro organismo, además de utilizar las fuentes extracelulares de colesterol^{2,3,4,5}, es también capaz de sintetizarlo, este proceso se lleva a cabo principalmente en el hígado y en el intestino. Por el contrario, son muy escasos los órganos y tejidos capaces de degradar al colesterol o de contribuir a su eliminación, el primer sitio lo ocupa el hígado, que es responsable de la transformación de un 80-90% del colesterol en ácidos biliares. Otros órganos que en menor grado contribuyen a catabolizar el colesterol son las gónadas y las glándulas suprarrenales, es decir tejidos con capacidad de síntesis de hormonas esteroideas, tales como progesterona, testosterona, estradiol y cortisol y la piel que puede sintetizar vitamina D, a partir de colesterol y que también lo excreta como uno de los componentes del sebo. El intestino, principalmente el ileon también contribuye al catabolismo del colesterol al excretarlo hacia la luz intestinal donde en parte puede ser transformado en coprostanol y coprostanona por acción bacteriana.

El colesterol puede obtenerse de la dieta o sintetizarse *de novo*. Un adulto sometido a dieta pobre en colesterol sintetiza

normalmente unos 800 mg de colesterol por día. La velocidad de formación del colesterol, está fuertemente influida por la cantidad absorbida de la dieta. Esta retro-regulación está mediada por cambios en la actividad de la HMG-CoA reductasa, esta enzima cataliza la formación del ácido mevalónico, que constituye la etapa crucial de la biosíntesis del colesterol. El colesterol de la dieta suprime la síntesis de la reductasa hepática e inactiva las moléculas preexistentes de esta enzima.

En general, las células distintas de las hepáticas e intestinales obtienen el colesterol del plasma, en vez de sintetizarlo *de novo*. Su fuente principal de colesterol son las LDL. Las etapas de la incorporación de colesterol por la vía de las LDL son:

1. La LDL se une a un receptor específico de la membrana plasmática de las células extrahepáticas. Los receptores de las LDL están localizados en zonas especializadas llamadas hoyuelos forrados que contienen proteínas denominadas clatrininas.
2. El complejo receptor-LDL se introduce en la célula por endocitosis, es decir que la membrana plasmática contigua al complejo se invagina y luego se fusiona formando una vesícula endocelular.
3. Estas vesículas que contienen LDL se fusionan posteriormente con los lisosomas, que poseen una amplia gama de enzimas degradativas. El componente proteico de la LDL se hidroliza

para dar aminoácidos libres. Los ésteres de colesterol de las LDL se hidrolizan por una lipasa ácida lisosomal.

4. El colesterol no esterificado que se libera puede utilizarse para la biosíntesis de membranas. También puede reesterificarse para almacenarse dentro de la célula.

El contenido de colesterol de las células que metabolizan activamente las LDL se regula de dos maneras. En primer lugar, el colesterol liberado suprime la formación de la HMG-CoA reductasa, lo cual a su vez inhibe la síntesis *de novo* del colesterol. En segundo lugar, el propio receptor de las LDL está sujeto a regulación por retroalimentación (feedback). En los fibroblastos, la vida media del receptor de las LDL es del orden de un día.

Cuando abunda el colesterol dentro de la célula, dejan de sintetizarse nuevos receptores de LDL, y así queda bloqueada la incorporación de colesterol procedente del plasma.

Una parte importante del conocimiento de la síntesis de colesterol procede del trabajo de Konrad Bloch en 1940, que utilizó acetato marcado isotópicamente, en sus átomos de carbono, y lo administró a ratas. El colesterol sintetizado por estas ratas contenía el isótopo marcado, indicando que el acetato es un precursor del colesterol. De hecho los 27 átomos de carbono del colesterol proceden de la acetil-CoA. Esta sustancia considerada como la piedra angular del metabolismo, puede formarse a partir de carbohidratos, lípidos y proteínas. Las enzimas que participan en las reacciones de síntesis se localizan en el citoplasma y en el

retículo endoplásmico de la célula.

Los pasos enzimáticos de la colesterogénesis^{22,24}.

Formación de la HMG-CoA.

Es el primer paso de la biosíntesis del colesterol. En la primera reacción, dos moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil CoA. En seguida la acetoacetil-CoA se condensa con otra molécula de acetil CoA para formar HMG-CoA, (fig.3).

Conversión de HMG-CoA a mevalonato.

Esta conversión se realiza a través de la reducción del grupo tioéster a un grupo alcohol primario. Esta reacción requiere dos moléculas de NADPH + H⁺ como agente reductor y es catalizada por la HMG-CoA reductasa, enzima localizada en el retículo endoplásmico y que regula este paso limitante en la biosíntesis del colesterol.

Síntesis de isopentenil pirofosfato a partir de mevalonato.

El mevalonato es convertido a 3-fosfo 5-pirofosfomevalonato a través de tres fosforilaciones consecutivas y por la participación de tres enzimas: mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y 5-pirofosfomevalonato cinasa. El 3-fosfo 5-pirofosfomevalonato, pierde CO₂ y Pi por medio de la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa, produciendo el 3-isopentenil pirofosfato conocido como unidad isoprenoide o isopreno activo.

Síntesis de escualeno a partir de isopentenil pirofosfato.

Esta etapa de biosíntesis de colesterol se inicia con la

isomerización del isopentenil pirofosfato a dimetilalil pirofosfato, por medio de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa. Estos dos isómeros de 5 carbonos se condensan para formar un intermediario de 10 carbonos, geranil pirofosfato, por acción de la geranil pirofosfato sintetasa. En el siguiente paso, se une otra molécula de isopentenil pirofosfato, para dar un compuesto de 15 carbonos, farnesil pirofosfato. Finalmente, dos moléculas de este intermediario se condensan por el extremo que contiene el pirofosfato para formar el escualeno, en una reacción catalizada por la enzima escualeno sintetasa.

Conversión del escualeno a lanosterol.

El escualeno se une a un transportador proteico citoplasmático, específico, la proteína transportadora de esteroides. Esta conversión ocurre con los intermediarios unidos a este transportador. La enzima escualeno epoxidasa cataliza la conversión del escualeno en 2-3 óxido de escualeno, interviniendo el oxígeno molecular activado. Este compuesto sufre una ciclización anaeróbica a lanosterol, catalizada por la escualeno óxido ciclasa. El primer intermediario que se forma contiene grupos metilo en las posiciones C-8 y C-14 de la estructura cíclica. En el siguiente paso el grupo metilo originalmente unido al C-14 emigra al C-13, para constituir el grupo metilo angular C-18 que se proyecta entre los anillos C y D del núcleo esteroide. Además el grupo metilo originalmente unido al C-8 emigra al C-14 sitio en el que se proyecta en configuración alfa.

El lanosterol se caracteriza por tener un grupo hidroxilo en el C-3, dobles ligaduras entre C-8 y C-9 y entre C-24 y C-25. Este compuesto contiene además dos grupos metilo en el C-14.

Formación del colesterol a partir del lanosterol.

En esta última etapa se llevan a cabo cambios en el núcleo esteroideo y en la cadena lateral. El grupo metilo en el C-14 es oxidado a CO_2 , para formar el 14 desmetil lanosterol. En la misma forma, los dos grupos en el C-14 son eliminados, para dar el compuesto conocido como zimosterol. Este compuesto por un movimiento de la doble ligadura entre C-8 y C-9, a la posición entre C-8 y C-7, se transforma en delta 7, 24 colestadienol. El siguiente intermediario, el desmosterol, se forma por un desplazamiento ulterior de la doble ligadura en el anillo B, para tomar la posición entre C-5 y C-6, como en el colesterol; las reacciones de descarboxilación y de reducción requieren $\text{NADPH} + \text{H}^+$. **Gasto energético para la síntesis del colesterol²⁴.**

La síntesis de una molécula de colesterol representa un gasto considerable de energía y equivalentes reductores. El proceso global requiere 18 moles de acetyl-CoA, 36 moles de ATP y 17 moles de NADPH para formar un mol de colesterol.

Aún cuando se requieren 6 moléculas de HMG-CoA, sólo 27 de los 36 átomos de carbono se retienen en el producto final. De los 36 moles de ATP requeridos, 18 son usados para la formación de acetyl-CoA en la reacción catalizada por la enzima citoplasmática citrato liasa, por lo tanto, la acetyl-CoA utilizada para la síntesis de

colesterol proviene casi totalmente del metabolismo mitocondrial. La acetil-CoA sale de la mitocondria formando parte de citrato, el cual es hidrolizado en el citoplasma a oxaloacetato y acetil-CoA por medio de la enzima citrato liasa. Esta reacción consume una molécula de ATP por cada molécula de acetil CoA producida. Los 18 moles de ATP restantes, son utilizados en la conversión de mevalonato hasta la forma pirofosforilada del isopreno activado.

Etapas de la síntesis del colesterol:

1a. El acetil CoA es convertido en un tioéster intermediario de 6 átomos de carbono, la HMG-CoA.

2a. Es la conversión del HMG-CoA en escualeno, un hidrocarburo no cíclico de 30 átomos de carbono. El intermediario en esta etapa es la unidad de isopreno de 5 átomos de carbono que aparece en dos formas isoméricas fosforiladas, el isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato.

3a. El escualeno es ciclizado y convertido en un esterol de 27 átomos de carbono. Las reacciones del escualeno a colesterol se producen en el retículo endoplásmico. Muchos intermediarios del final de la ruta se unen físicamente a proteínas citoplásmicas, las proteínas transportadoras de esteroides.

Regulación del metabolismo del colesterol²¹.

El colesterol de las LDL es tomado por las células a través de receptores específicos que permiten su endocitosis. Los ésteres del colesterol son hidrolizados en los lisosomas y el colesterol libre

es incorporado a las membranas, las que continuamente se están sintetizando y degradando. Un aumento neto del colesterol disponible afectaría al menos tres procesos que evitan el exceso de CNE: represión de la síntesis de HMG-CoA reductasa, represión de la formación de receptores para LDL y estimulación de la ACAT.

En el hígado existen procesos metabólicos que no sólo mantienen la homeostasis en el colesterol del hepatocito, sino del organismo en general. El hígado empaqueta colesterol para exportarlo al plasma a través del ensamblaje y secreción de las VLDL; recibe colesterol de fuentes extrahepáticas por endocitosis de LDL, acepta rápidamente colesterol dietario, vía endocitosis de los remanentes de QM y elimina colesterol hacia la bilis como tal y como ácido cólico y derivados. A través de todo este proceso el hepatocito determina la velocidad de formación de colesterol *de novo*, a partir de ácidos grasos, carbohidratos, o aminoácidos, vía acetil CoA, esta síntesis es regulada por la HMG-CoA reductasa. Además la captación de las LDL, ricas en colesterol limita el número de los receptores de superficie.

El colesterol es un componente de la membrana plasmática de todos los eucariontes, es esencial para el crecimiento y viabilidad de las células de los organismos superiores. Sin embargo un exceso de colesterol puede resultar letal porque contribuye a la formación de placas ateroscleróticas. Es evidente que el metabolismo del colesterol debe regularse con precisión. Cuando abunda el colesterol dentro de la célula, dejan de sintetizarse nuevos receptores de LDL, y así queda bloqueada la incorporación de más

colesterol procedente de las LDL del plasma. La carencia de receptores de LDL origina hipercolesterolemia y aterosclerosis precoz. La gran importancia del receptor de LDL ha sido valorada a partir de los estudios de casos de HF.

La HF fue identificada en 1939 como un error del metabolismo, que causa niveles elevados de colesterol en sangre e infarto de miocardio en gente joven.

Este trastorno corresponde a alteraciones en un solo gen y es transmitido en una forma dominante. En 1960 se demostró que hay dos formas del padecimiento, una heterocigica y otra homocigica. Los heterocigos heredan el gen que ha sufrido mutación y existe un caso por cada 500 habitantes. Los niveles sanguíneos de colesterol en estos pacientes corresponden al doble de lo normal y presentan cardiopatía isquémica entre la tercera y cuarta décadas de la vida²³.

Si dos heterocigóticos de HF se casan, cada hijo que procreen tiene una probabilidad en cuatro de heredar dos copias del gen alterado, una de cada progenitor. En este caso se trataría de un homocigo, del cual existe un caso por cada millón de habitantes. Estos pacientes tienen una colesterolemia de seis tantos por encima de lo normal, presentando cardiopatía isquémica a edades muy tempranas (3 a 4 años), con una supervivencia que no va más allá de la adolescencia, esto a pesar de contarse actualmente con técnicas quirúrgicas para sustituir los segmentos de coronarias dañados por injertos de venas del mismo paciente (arteriotomía).

En piel y tendones se forman nódulos prominentes de

colesterol, denominados xantomas. Es más perjudicial el depósito de colesterol en las placas arteriales originando la aterosclerosis. De hecho la mayoría de los homócigos mueren antes de los diez años de edad porque la enfermedad afecta a las arterias coronarias. En los heterócigos cursa con un carácter más variable y benigno. El defecto molecular en los casos de HF, es la carencia o la deficiencia funcional de receptores para las LDL. Los homócigos casi no tienen receptores para las LDL mientras que los heterócigos tienen la mitad del número normal. En consecuencia, la entrada de las LDL en las células no hepáticas está perturbada y, de este modo aumenta el nivel plasmático de las LDL. Esta enfermedad, también puede ser consecuencia de un defecto en el proceso de introducción del complejo LDL-receptor en las células.

Trastornos en el metabolismo del colesterol.

La aterosclerosis es una causa de morbilidad y mortalidad importante en los países desarrollados²¹. El padecimiento se caracteriza por el depósito de lípidos en la capa íntima de los vasos arteriales, en especial de colesterol y sus ésteres.

El papel del colesterol en la aterosclerosis se ha aceptado sobre todo por los datos obtenidos en los estudios epidemiológicos. Una elevación del colesterol del plasma sanguíneo, en particular del C-LDL, es un factor de riesgo de aterosclerosis. Por otro lado existe protección cuando el colesterol que se eleva es el C-HDL.

Factores de riesgo primarios y secundarios asociados con enfermedad cardíaca coronaria²¹

Primarios: Predisposición genética
Hipertensión arterial
Hábito tabáquico
Hipercolesterolemia
C-LDL elevado
C-HDL disminuido
Consumo de anabólicos esteroides
alcoholismo

Secundarios: Vida sedentaria
Obesidad
Edad
Sexo masculino
Tensión nerviosa o estrés
Diabetes mellitus
Hiperuricemia (ácido urico elevado)
Nefropatía
Anticonceptivos orales.

Biosíntesis de los ácidos biliares²⁶.

Los ácidos biliares son sintetizados a partir del colesterol, y constituyen el principal destino metabólico de este compuesto.

Los principales ácidos biliares en el hombre son: cólico, quenodesoxicólico, deoxicólico y litocólico.

Las sales biliares son derivados polares del colesterol. Estos compuestos son detergentes de elevada efectividad puesto que contienen regiones polares y apolares. Las sales biliares, se sintetizan en el hígado, se almacenan y concentran en la vesícula biliar, y se liberan en el intestino delgado. Las sales biliares, son el principal constituyente de la bilis, por su acción detergente, solubilizan los lípidos de la dieta. El incremento resultante del área superficial de los lípidos tiene dos consecuencias: promover su hidrólisis por las lipasas y facilitar su absorción. Las sales biliares son el principal producto del catabolismo del colesterol. El colesterol se convierte en ácido trihidroxicoprostanóico y éste en colil-CoA, que es el intermediario activado en la síntesis de la mayoría de las sales biliares.

Transporte inverso del colesterol.

Una importante función de las HDL es la de retirar el exceso de colesterol de los tejidos y canalizarlo para su depósito en el hígado. La importancia de esta función reside en que el núcleo esteroideo no puede ser degradado y el hígado es el único órgano que puede librar al cuerpo del exceso de colesterol, al segregarlo a la bilis para su excreción en las heces. Al proceso de transporte de colesterol desde los tejidos extrahepáticos al hígado se le denomina transporte inverso. Además de las HDL, la LCAT y las

transferasas de lípidos, las VLDL también tienen un papel en el transporte inverso del colesterol.

Transferencia superficial del colesterol.

El transporte del colesterol desde las células a las HDL se produce a través del proceso de transferencia superficial. Este mecanismo incluye la difusión del colesterol desde la membrana plasmática de las células a la capa superficial de las HDL. En realidad se trata de un proceso de intercambio en que el colesterol puede transferirse de un lado a otro de la célula, a la superficie de la lipoproteína. Sin embargo y por la reacción con la LCAT, el colesterol que entra en las HDL, se transforma rápidamente en CE, tras lo cual se traslada a los núcleos de las HDL o se transfiere a las VLDL. La rápida eliminación del colesterol tras su unión con las HDL hace que el movimiento cambie de dirección y que pase de las células a las HDL, con lo que el colesterol es transportado desde los tejidos al plasma.

LAS LIPOPROTEINAS^{17,18}

Las lipoproteínas plasmáticas son agregados macromoleculares de lípidos y proteínas que transportan en general lípidos muy apolares principalmente TAG y CE. La mayor parte del agregado constituye el centro, en el cual se pueden encontrar los lípidos apolares empacados como si fuera una gota de aceite. En la periferia se localizan los fosfolípidos con sus grupos polares orientados hacia el exterior de la partícula, formando una

interfase lípido-agua, que permite la estabilidad del agregado molecular. La membrana plasmática de ciertas células contiene receptores para lipoproteínas. Dos receptores han sido identificados, el primero reconoce la apoproteína B-100, presente en las LDL, conocido como receptor para LDL; el segundo reconoce la apoE presente en el remanente de los QM. El receptor para LDL se encuentra en muchos tejidos, incluyendo fibroblastos y hepatocitos, por el contrario el receptor para los restos de QM, se encuentra solamente en el hígado. Las LDL inhiben la síntesis de colesterol, al ser endocitadas por la célula; el primer paso en este proceso es el reconocimiento de la LDL por su receptor específico. El sitio de reconocimiento de LDL se encuentra asociado con la apolipoproteína B-100. Existen alrededor de 15,000 receptores por célula que se incrementan en la fase activa de división celular; estos receptores se distribuyen uniformemente sobre la superficie celular, agrupándose posteriormente en regiones de la membrana especializada para la endocitosis. Estas regiones, conocidas como hoyos recubiertos contienen la proteína clatrina. Una vez unida la LDL, las regiones de la membrana que contienen el complejo receptor-LDL se invaginan, migran a través del citoplasma de la célula y se funden con los lisosomas. La partícula proteica de la LDL es degradada en los lisosomas por diversas proteasas y la colesterol esterasa; las primeras degradan la apo B-100 hasta aminoácidos y la segunda hidroliza el CE. En este proceso, el receptor regresa nuevamente a la membrana plasmática para captar otras moléculas de LDL. El colesterol proveniente de las LDL y liberado en el

citoplasma, controla considerablemente el metabolismo del propio colesterol, a través de tres procesos. En primer lugar, reduce la capacidad de la célula para elaborar su propio colesterol, inhibiendo la síntesis de la enzima HMG-CoA reductasa. La supresión de esta enzima obliga a la célula a depender del colesterol exógeno. En segundo lugar, el incremento del colesterol de fuente exógena, estimula la actividad de la ACAT en la esterificación del colesterol; el CE, al igual que el CNE, inhiben la síntesis de la HMG-CoA reductasa. En tercer lugar, la acumulación de colesterol en la célula pone en marcha un mecanismo de retroinhibición para la síntesis de nuevos receptores de LDL.

Captación hepática de lipoproteínas.

El hígado es el sitio en el que se retiran los restos de QM presentes en el plasma. Estas partículas contienen abundante CE, proveniente de la dieta y, al igual que las LDL, ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática. La membrana del hepatocito contiene un receptor para lipoproteína, que reconoce la apoE, presente en los restos de QM. Al efectuarse la unión de la apoE con el receptor específico, la partícula es captada y degradada por la célula hepática.

El hígado constituye el principal tejido para eliminar las LDL; se ha calculado que este órgano capta aproximadamente 50% de las LDL del plasma. Este proceso es importante en la regulación de la concentración plasmática de colesterol. Bajo ciertas condiciones se ha demostrado que las membranas de los hepatocitos contienen un

segundo receptor lipoproteico, que reconoce tanto la apoB como la apoE.

Las proteínas específicas que se encuentran en las Lp se han llamado apoproteínas o apolipoproteínas. Una porción de la apoproteína se encuentra embebida en el centro de la Lp y el resto se expone al medio. La porción expuesta lleva a cabo las funciones de la proteína, esto es reconoce enzimas específicas u otras proteínas de transporte para dirigir el metabolismo de la Lp a su sitio adecuado.

Clasificación de las lipoproteínas.

La diversidad en la estructura y función de las Lp ha hecho que se clasifiquen en:

Quilomicrones, densidad menor de 0.94 kg/l (sf 400); lipoproteínas de muy baja densidad, con densidad mayor de 0.94 y menor de 1.006 kg/l (sf 20 a 400, VLDL, very low density lipoproteins); lipoproteínas de baja densidad, densidad mayor de 1.006 y menor de 1.063 kg/l (sf 0-20 LDL, low density lipoproteins), ; lipoproteínas de alta densidad, densidad superior a 1.063 pero inferior a 1.21 kg/l (HDL, high-density lipoproteins), Lipoproteínas de muy alta densidad, densidad superior a 1.21 kg/l (VHDL, very high density lipoproteins).

Existen otros componentes y subfracciones. Uno de ellos son los residuos de los QM, que se forman a partir de los QM. Los dos subtipos de HDL, poseen funciones y propiedades diferentes.

Separación electroforética.

Los principales tipos de Lp plasmáticas pueden separarse por electroforesis haciéndose visibles cuatro bandas principales. Una banda permanece en la posición original y contiene los QM. Otra denominada de las β -Lp, se desplaza con las β -globulinas y contiene las LDL. Una tercera banda se desplaza situándose por delante de la región β y se denomina banda de las Lp pre- β . Esta fracción contiene las VLDL.

La cuarta banda, denominada de las alfa Lp, se desplaza con las alfa globulinas y contiene las HDL. Existe otro grupo de Lp que ha sido llamado IDL y cuando está presente en el plasma se desplaza junto con las β Lp. Los residuos de QM se reparten entre las regiones β y pre- β .

Las Lp plasmáticas son consideradas como un grupo de familias, caracterizadas por su contenido de apoproteínas:

-Lp que contienen una sola apoproteína, primarias o simples.

-Lp que contienen dos o más apoproteínas, secundarias o complejas.

Como ejemplo de este grupo tenemos a las Lp que contienen apo A-I, A-II y D.

La Lp(a), es una Lp rica en colesterol presente en todos los individuos, excepto en los sujetos abetalipoproteinémicos. La Lp(a) contiene apo B y apo(a), siendo esta última particularmente rica en carbohidratos. Los niveles plasmáticos de Lp(a), son determinados genéticamente y pueden variar de 50 a 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Las concentraciones altas de esta Lp parecen estar relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis, independientemente de

su alto contenido de colesterol.

Las apoproteínas

En la nomenclatura mundialmente aceptada de las apolipoproteínas, propuesta en 1980 por Alaupovic, éstas se denominan según el patrón electroforético de las lipoproteínas que las contengan en mayor cantidad; de esta forma, las apo A predominan en las alfa-Lp, las apo B en las β -Lp y las apo C en los QM.

Las funciones que se les han reconocido son divididas en tres grandes categorías: activación enzimática; unión a receptor; participación en la síntesis *de novo*.

Los pesos moleculares de las apolipoproteínas varían desde 500,000 para la apo B hasta menos de 9,000 para las apo-AII y C.

La producción se lleva a cabo principalmente en el hígado e intestino, pero también las células periféricas son capaces de sintetizarlas, como sucede con la apo E, que puede ser producida por los macrófagos.

Función de las apoproteínas.

En cuanto a su función sólo se conoce de algunas. La apo A-I es la principal proteína estructural de las HDL y es un activador de la LCAT. La apo B-100, es el componente estructural principal de las VLDL, IDL y LDL. Además la apo B-100 también interviene en la unión de las LDL a los receptores LDL de alta afinidad de la superficie celular. La apo B-100 se sintetiza en el hígado. La apo

B-48 se sintetiza en el intestino. Es el principal componente de los QM. La apo C-II, es el activador de la Lp lipasa. La apo C-III, inhibe la captación de VLDL por el hígado. La apoE es el factor de reconocimiento para la unión de los residuos de QM a sus receptores en el hígado y para la unión de las IDL al receptor de LDL.

Función de las lipoproteínas

Desempeñan tres funciones principales. Una es transportar las grasas de la dieta, desde la mucosa intestinal en donde han sido absorbidas, hasta los restantes tejidos del cuerpo. Esta función la realizan los QM y los residuos de QM. La segunda es la de transportar los TAG desde el hígado a los otros tejidos, donde pueden almacenarse los lípidos y ser oxidados para obtener energía. Las VLDL son las encargadas de llevar a cabo esta función. Después de que las VLDL liberan los TAG en los tejidos, los constituyentes restantes son devueltos al hígado en la forma de IDL y LDL. Un tercer sistema actúa como mediador en el transporte inverso del colesterol. Este sistema, formado por las HDL y LDL, devuelve al hígado el exceso de colesterol de los tejidos extrahepáticos.

Biosíntesis de las lipoproteínas.

El hígado y el intestino son los órganos principales que participan en la síntesis de las Lp. Intervienen en el metabolismo de las grasas de origen endógeno y exógeno. Las Lp que se originan en estos tejidos son los QM y las VLDL, mientras que las IDL y LDL tienen un origen periférico es decir se forman mediante la

transformación vascular de las VLDL y QM. En estos tejidos la síntesis de los componentes lipídico y proteico de las Lp se localiza en diferentes orgánulos celulares, mientras que la formación de las apoproteínas se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso; la síntesis de fosfolípidos, TAG y colesterol se localiza en el retículo endoplásmico liso. El acoplamiento de las vías sintéticas resulta en la formación de una nueva Lp.

Los QM, las VLDL y las formas precursoras de las HDL son sintetizados en el interior celular. El intestino delgado produce los QM, el hígado las VLDL y ambos tejidos producen los precursores de las HDL. Tras su secreción, estas Lp pasan por una intensa reestructuración en la circulación. Se añaden algunos lípidos y apoproteínas y otros se extraen, lo que da lugar a la transformación de estas partículas originales en nuevos tipos de Lp. Los QM son transformados en residuos de QM, las VLDL en IDL y posteriormente en LDL y los precursores HDL se convierten en HDL, HDL₃, y HDL₂. Así se generan en el plasma cuatro tipos de lipoproteínas: residuos de QM, IDL, LDL, y las formas maduras de HDL.

Síntesis de quilomicrones.

Las células de la mucosa del intestino delgado absorben los productos de la digestión lipídica y los lípidos contenidos en la bilis. A través de las vellosidades entra en la célula una mezcla de colesterol, ácidos grasos y 2-monoacilglicerol; a partir de los

ácidos grasos y del monoacilglicerol se sintetizan los TAG en el retículo endoplásmico liso. En el mismo retículo, se unen a los TAG, el colesterol y los fosfolípidos para formar una micela.

Las apoproteínas necesarias, apo B-48, apo A-1, apo A-II, y apo A-IV, se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso e irán combinándose con los lípidos según se vayan trasladando desde el retículo endoplásmico liso y rugoso al aparato de Golgi. La disponibilidad de las sustancias que forman la superficie de los QM (apoproteínas, fosfolípidos y colesterol) parece regular la síntesis de los mismos. El tamaño de los QM depende de la cantidad de TAG que está disponible en el enterocito. A mayor cantidad de TAG disponibles, mayor será el tamaño de los QM. Estos QM contendrán más TAG, y por tanto la proporción núcleo/superficie será mayor. A continuación son secretados al espacio intercelular lateral y de ahí pasan a la circulación linfática. Inmediatamente después de su secreción se producen modificaciones en su estructura, de forma que los QM maduros presentes en el plasma tienen una composición lipídica y de apoproteínas ligeramente diferente a la de las partículas recién secretadas.

Síntesis de VLDL.

Son dos las fuentes de las que provienen los ácidos grasos que forman los TAG presentes en las partículas de VLDL. Una está dada por los carbohidratos de la dieta, que son convertidos en ácidos grasos en el hepatocito; la otra corresponde a los ácidos grasos absorbidos por el hígado. Estos últimos provienen de los ácidos

grasos del plasma o de los lípidos contenidos en las Lp plasmáticas.

Los TAG, fosfolípidos y colesterol presentes en el retículo endoplásmico liso se combinan para formar una micela. Las apoproteínas necesarias, apo B-100, apo E, apo C-I, apo C-II, apo C-III, son sintetizadas y procesadas en el retículo endoplásmico rugoso. La apo B-100 es glucosilada parcialmente en el retículo endoplásmico rugoso y a continuación se une a los lípidos en el punto de unión del retículo endoplásmico rugoso con el liso.

Las otras apolipoproteínas se irán uniendo secuencialmente al complejo lípido-apolípido en el aparato de Golgi, donde tendrá lugar la continuación de la glucosilación y la unión con los fosfolípidos.

Síntesis de HDL.

Las formas precursoras de las HDL, denominadas nacientes se forman en el hígado y en el intestino delgado; se sabe muy poco sobre este proceso y su regulación. El hígado segrega una partícula con forma de disco que contiene fosfolípidos, colesterol y apo E. Estas HDL discoidales se transforman en HDL-3 tras la secreción. Durante este proceso, se añaden los lípidos, se esterifica el colesterol, se extrae la apo E y se suma la apo A-I. Existen algunas pruebas que señalan que el intestino también segrega partículas discoidales similares, con la diferencia de que contienen apo A-I en vez de apo E. Estos precursores se convierten en HDL-3 en cuanto son secretados. Otros datos por el contrario

sugieren que el intestino no secreta directamente los precursores de HDL, los cuales provienen de la superficie de los QM, quienes sufren la reestructuración inmediatamente después de ser secretados.

Factores reguladores de la síntesis de lipoproteínas.

Las grasas ingeridas en la alimentación aumentan la producción de QM por el intestino, y la producción hepática de VLDL aumenta cuando existen ácidos grasos disponibles en exceso.

Los ácidos grasos insaturados son más eficaces que los saturados para estimular la formación de VLDL, así como los de cadena larga producen mayor efecto que los de cadena corta o mediana^{24,25}. Los carbohidratos de la dieta también aumentan la producción de VLDL al aumentar la síntesis de los ácidos grasos y estimular la liberación de insulina. El alcohol también incrementa la producción de VLDL al hacer que un mayor número de ácidos grasos esté disponible para la síntesis hepática de los TAG.

Metabolismo de las lipoproteínas.

Los QM sintetizados por la mucosa intestinal contienen sobre todo TAG; aproximadamente 98% de su peso seco corresponde a lípidos. En consecuencia tienen una densidad extremadamente baja. Son complejos moleculares de gran tamaño que reflejan la luz y dan al plasma un aspecto lechoso cuando sus concentraciones en él son elevadas.

Son secretados a la linfa y de ahí entran a formar parte del

plasma sanguíneo pasando a través del conducto torácico. Su función principal es la de transportar las grasas de la alimentación, sobre todo en forma de TAG al interior del cuerpo. El otro lípido transportado por los QM y proveniente de la alimentación es el colesterol, que se convierte en CE antes de incorporarse a estas Lp.

Residuos de quilomicrones.

Los QM son catabolizados en el plasma y transformados en partículas más pequeñas y de mayor densidad. Los productos del catabolismo denominados residuos de QM, se forman cuando casi todos los TAG presentes en los QM han sido hidrolizados por la Lp lipasa. Contienen fosfolípidos, CNE, CE, apo E y los restantes TAG. Tienen una densidad semejante a la de las IDL y las pequeñas VLDL, encontrándose en la fracción Sf 20 a 40 de la centrifugación. El hígado los extrae de la circulación a través de un receptor al que se une la apo E, diferente al receptor de LDL. La mayoría de los TAG transportados por los QM son hidrolizados por la Lp lipasa de los capilares, al tiempo que los ácidos grasos liberados son absorbidos por los tejidos, sobre todo por los adipocitos y músculos. La partícula residual, rica en CNE y en apo E, es captada por el hígado. Esta es la vía principal por la que el colesterol ingerido en la dieta es conducido al hígado.

Lipoproteínas de muy baja densidad.

Las VLDL también son complejos de gran tamaño. Contienen 90%

de lípidos, de los que del 50 al 65% corresponden a TAG. Son llevadas desde el hígado a los otros tejidos, sobre todo al tejido adiposo.

Lipoproteínas de baja densidad.

La mayoría del colesterol que existe en el plasma sanguíneo humano normal, está en las LDL. Cerca del 75% del colesterol de las LDL se encuentra en forma de CE. La apo B-100 corresponde al 98% de las proteínas presentes en las LDL. Éstas se forman en el plasma durante el catabolismo de las VLDL, por lo que pueden ser consideradas como un residuo de éstas.

Cerca de la mitad de las LDL circulantes son absorbidas por el hígado, en tanto que las restantes lo son por los tejidos extrahepáticos. Gran parte del proceso de captación de las LDL, está mediado por el receptor LDL, al que se une la apo B-100. Sin embargo una parte de la absorción de LDL se produce sin la intervención de este receptor, esta vía recibe el nombre de absorción no mediada por receptores.

Lipoproteínas de densidad intermedia.

Las IDL se forman en el plasma durante la conversión de las VLDL en LDL. Contienen TAG y colesterol en cantidades intermedias entre las VLDL y las LDL. Algunas de las IDL formadas son directamente absorbidas por el hígado, mientras que las restantes se convierten en LDL. En condiciones normales, la conversión de VLDL en LDL se realiza tan eficazmente que las IDL no llegan a

acumularse en cantidades apreciables en la muestra de plasma obtenida tras una noche de ayuno. Al igual que las LDL, la absorción de las IDL, por el hígado, está mediada por el receptor de LDL. En este caso sin embargo, es la apo E la que media la unión.

Este sistema de Lp tiene dos funciones principales. Una, es la de extraer del hígado el exceso de ácidos grasos. Los ácidos grasos, que a menudo provienen de la dieta de carbohidratos, son liberados como TAG en las VLDL. Después de que los TAG son hidrolizados por la Lp lipasa, los ácidos grasos son absorbidos fundamentalmente por los adipocitos y el músculo. La otra función de este sistema es la de aceptar el CE que se forma en el plasma. El CE se traslada de las HDL a las VLDL. Las LDL, el producto final formado a partir de las VLDL, retienen el CE, del que tienen un elevado contenido. Las LDL proporcionan colesterol a los tejidos extrahepáticos o lo conducen al hígado para su excreción en la bilis.

Lipoproteínas de alta densidad.

Las HDL se sintetizan en el hígado y en el intestino. Actúan como catalizadores, facilitando el catabolismo de las VLDL y de los QM. La apoproteína C es transferida de las HDL a las VLDL; también se produce la transferencia de lípidos.

Las HDL liberadas en el plasma están compuestas básicamente por fosfolípidos y apoproteínas, y tienen una estructura plana y discoidal. Mientras conservan esta configuración se les denomina

HDL nacientes. Una parte de las HDL pasa directamente al plasma desde el hígado y posiblemente también desde el intestino. El resto se forma en el plasma, a partir de los componentes de la capa superficial de los QM, después de que éstos han sido secretados por las células de la mucosa intestinal. A continuación, las HDL nacientes absorben los lípidos y las apoproteínas de las VLDL y de los QM, según se vayan catabolizando en el plasma estas grandes Lp ricas en TAG. Las HDL también toman el colesterol liberado por los tejidos extrahepáticos. La reacción catalizada por la LCAT tiene lugar en las HDL, y el colesterol absorbido se transforma en CE que se traslada al centro de la estructura discoidal. Al producirse este cambio, la HDL modifica su configuración, haciéndose esférica.

Las Fracciones HDL₂ y HDL₃.

Las HDL se separan por ultracentrifugación en dos fracciones: La HDL₂ con una densidad que oscila entre 1.060 y 1.125, y la HDL₃ con una densidad de 1.125 a 1.210. El 40% de las HDL₂ está compuesto por proteínas y el 45% por lípidos. Más del 90% de las proteínas presentes en los dos subtipos corresponde a la apo A-I y apo A-II, siendo la proporción de ambas de 3:1. Existen evidencias de que las HDL₃ se transforman en HDL₂ como resultado de dos procesos. Uno es la absorción de lípidos y de apoproteínas que quedan libres durante el catabolismo de las VLDL, de los QM y de sus intermediarios. El otro es la absorción de CNE liberado de los tejidos. La HDL₃ es uno de los principales puntos en que tiene lugar la reacción de la LCAT, gracias a la cual el colesterol plasmático se esterifica.

Existe un modelo que explica que las HDL nacientes provienen del hígado o del intestino. Las HDL discoides se transforman en HDL₁ esféricas y, a continuación, en HDL₂. Para las HDL se abren dos posibles vías, una consiste en la hidrólisis parcial por la lipasa hepática, lo que conduce a la transformación de HDL₂ en HDL₃; la otra es la unión a los receptores y su absorción por los tejidos, fundamentalmente por el hígado.

Enzimas del metabolismo lipoproteico

En el metabolismo e interconversión de las Lp plasmáticas intervienen cuatro enzimas: la lipasa ácida, la LCAT, la Lp lipasa y la lipasa hepática.

La lipasa ácida es una hidrolasa lisosómica que actúa sobre las Lp una vez que éstas han sido absorbidas por endocitosis mediada por receptor. Esta enzima actúa intracelularmente tras la eliminación de la Lp de la circulación por endocitosis mediada por receptor. Esta enzima hidroliza los TAG y el CE que siguen formando parte de la Lp, liberando los ácidos grasos y el colesterol para su utilización en el interior celular.

La LCAT cataliza la esterificación del colesterol en el plasma. Esta enzima se sintetiza en el hígado y es secretada al suero. Actúa fundamentalmente sobre las HDL, donde tiene lugar la esterificación del colesterol que proviene de los tejidos o de los QM y las VLDL.

La Lp lipasa, es la enzima que hidroliza los TAG contenidos en

los QM circulantes y en las VLDL. Ejerce su acción en la superficie de las células del endotelio capilar. La apoproteína C-II presente en las VLDL y HDL activa esta enzima. La Lp lipasa está presente en numerosos tejidos, incluyendo el adiposo, las glándulas mamarias y el corazón. Esta enzima hidroliza la mayor parte de los TAG, convirtiéndolos en monoacilgliceroles; éstos son transportados al hígado, donde se degradan por la lipasa hepática en glicerol y ácido graso.

La lipasa hepática es una hidrolasa lipídica que se localiza en los vasos sinusoides del hígado, actúa sobre las IDL y las HDL₂. Hidroliza los TAG de estas Lp, así como los fosfoglicéridos presentes en su capa superficial. La lipasa hepática se relaciona con el procesamiento de las IDL, ya sea para su absorción por el hígado o para su transformación a LDL. Es probable que también participe en el procesamiento de las HLD₂, ya sea para su absorción por el hígado o para su reconversión en HDL₂.

Receptores para lipoproteínas.

Las Lp son eliminadas de la circulación a través de su unión a receptores localizados en la superficie de las membranas de las células blanco.

Receptor de LDL. Este receptor es el más conocido. Reconoce la apo B-100 y la apo E, por lo que también se le conoce como receptor apo B/E. Por intermedio de su unión con la apo B-100, el receptor de LDL actúa para la eliminación de las LDL del plasma. También actúa para la eliminación de las IDL, pero en este caso el factor

de reconocimiento es la apo E. Aunque las VLDL contienen apo B-100 y apo E, estas Lp no pueden unirse al receptor de LDL, posiblemente porque contienen apo C-III. El receptor de LDL se halla presente en el hígado, así como en determinados tejidos, incluyendo los fibroblastos y los monocitos. El receptor es regulado por los requerimientos de colesterol por parte de la célula. Se inhibe su captación cuando existe suficiente colesterol disponible y se activa cuando se necesita más colesterol. Esta regulación está controlada por la velocidad a la que se reciclan los receptores que existen en la superficie celular tras la endocitosis, o bien por el número de nuevos receptores sintetizados.

No todas las LDL se captan de la circulación por intermedio de los receptores LDL. Algunas LDL entran en los tejidos por pinocitosis, sin unirse al receptor. El porcentaje de LDL que entra en la célula por esta vía, no mediada por receptores, depende de la concentración de las LDL circulantes.

Otros receptores de lipoproteínas.

Se cree que existen otros tres receptores de Lp, además del receptor de LDL, que están participando en el metabolismo lipoprotéico; son los receptores de los residuos QM, de HDL y los receptores inespecíficos. Estos receptores están situados en el hígado, interviniendo en la absorción de los residuos de QM. El factor de reconocimiento es la apo E, por lo que este receptor también recibe el nombre de receptor apo E.

Proteínas transferidoras de lípidos.

Las proteínas que transfieren los lípidos facilitan el movimiento de fosfolípidos, TAG y CE de unas Lp a otras. En el plasma humano existen al menos dos transferasas lipídicas. Una transfiere CE, TAG y fosfolípidos. Las proteínas encargadas de transferir los lípidos desempeñan un papel importante en el metabolismo de las HDL. Trasladan el CE desde las HDL, por la LCAT, a las VLDL. Este cambio va acompañado de la transferencia de TAG desde las VLDL a las HDL, posiblemente por la acción de la misma transferasa. Las transferasas también cambian los fosfoglicéridos de los QM y de las VLDL a las HDL.

Enfermedades del metabolismo lipoprotéico.

Las alteraciones lipoprotéicas más frecuentes se manifiestan con una excesiva acumulación de lípidos en el plasma sanguíneo. Estas enfermedades constituyen las hiperlipoproteïnemias. Varias de estas enfermedades son factores de riesgo de aterosclerosis y de enfermedad de las coronarias. También existe un estado en el que los niveles de HDL son bajos; esto es también un factor que aumenta el riesgo de esta enfermedad.

Además existen algunos defectos genéticos raros, como la abetalipoproteinemia, la enfermedad de Tangier y la deficiencia de LCAT, que producen alteraciones en el metabolismo lipoprotéico.

Clasificación de las hiperlipoproteinemias, de acuerdo con el criterio de Fredrickson²⁹.

La hiperlipoproteinemia tipo I se caracteriza por presentar elevados los QM e hipertriacilglicerolemia. En el patrón electroforético aparece una banda muy intensa en el punto de aplicación, en cambio las demás Lp se tifican con poca intensidad. Si el suero de la muestra de sangre se coloca durante la noche en el refrigerador se formará una capa cremosa flotando en el sobrenadante, en cambio el infranadante se observará claro.

La hiperlipoproteinemia tipo IIa se caracteriza por tener concentraciones elevadas de colesterol plasmático, niveles normales de TAG y el aspecto del plasma es claro. El patrón electroforético se caracteriza por una elevación de las β Lp con pre- β normales. Este desorden lipoprotéico es reconocido como HF que exhibe las siguientes características:

- 1) Un deficiente número de receptores funcionales para β Lp.
- 2) La manifestación del trastorno en la infancia.
- 3) Xantomatosis en miembros en casos severos.
- 4) Enfermedad cardíaca coronaria prematura en la tercera y cuarta décadas.

La hiperlipoproteinemia tipo IIB, es otra forma de hiperlipoproteinemia familiar, pero combinada. En ella encontramos: ausencia y/o anomalía en el número de receptores funcionales para betalipoproteínas; expresión temprana de hipertriacilglicerolemia; patrones lipoprotéicos múltiples en familiares afectados en generaciones sucesivas; elevación de β y

pre β Lp. Sin embargo en la familia se pueden encontrar personas con tipo IIa y tipo IV.

La identificación de la hiperlipoproteinemia tipo III requiere que después de realizar la separación electroforética de las Lp se identifique una fracción lipoprotéica conocida como beta lipoproteínas flotantes, la cual tiene una movilidad intermedia entre la fracción beta y la fracción prebeta. Ahora se sabe que esta fracción corresponde a las IDL, las cuales aumentan en el plasma como consecuencia de una disminución de las apo E.

La hiperlipoproteinemia tipo IV se conoce también como hipertriacilglicerolemia endógena o hiperlipidemia inducida por carbohidratos; este término permite diferenciarla de la hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasa. La hiperlipidemia endógena excluye el tipo raro de hiperlipidemia tipo I, pero incluye el tipo V, poco frecuente, como una hiperlipidemia mixta, endógena y exógena.

La hiperlipidemia tipo IV, se caracteriza por una elevación de los TAG y de la fracción pre- β en la electroforesis, y ausencia de QM o de las VLDL anormales del tipo III. Los niveles de betalipoproteínas son normales y la determinación de C-LDL discrimina entre un tipo IV y uno IIb. El diagnóstico del tipo IV se puede hacer, si la concentración de TAG está aumentada y el colesterol total es normal o ligeramente aumentado, y el plasma en reposo no revela QM. El diagnóstico bioquímico se confirma si en la electroforesis se observa una banda teñida fuertemente en la región pre-beta y el C-LDL es normal.

La presencia de una banda pre-beta, con valores de TAG normales, ocurre con el incremento de la llamada Lp(a), una apolipoproteína pobre en TAG, que recientemente se ha asociado a padecimientos cardio-ateroescleróticos.

El diagnóstico de hiperlipidemia familiar primaria de tipo IV depende de los siguientes criterios:

1. Un patrón de tipo IV.
2. Uno o más miembros de la familia con el patrón tipo IV.
- 3.- Que no se detecten familiares con los tipos I y III ó V.

El diagnóstico de hiperlipoproteinemia secundaria tipo IV es en ocasiones obvio, cuando es consecuencia de padecimientos renales, endocrinológicos y gastrointestinales.

Las siguientes patologías pueden causar una elevación de las prebeta-lipoproteínas: alcoholismo o ingesta excesiva de alcohol, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, uremia, uso de anticonceptivos orales, embarazo (último trimestre), corticosteroides, pancreatitis (generalmente alcohólica), enfermedades en el almacenamiento de glucógeno, disproteinemias tales como lupus eritematoso sistémico, obesidad y diabetes mellitus.

La hiperlipidemia de tipo V se caracteriza por quilomicronemia al igual que el tipo I, sin embargo en esta dislipoproteinemia también están aumentadas las prebeta y con frecuencia las betalipoproteínas. La concentración de los TAG en el suero está muy aumentada. En cuanto al colesterol sérico su concentración puede estar elevada.

La presencia de una capa cremosa en el sobrenadante de la

muestra sanguínea, incubada por la noche a 4°C, constituye una identificación positiva para la presencia de QM. La porción infranadante de la muestra puede observarse opalescente o lipémica.

Existen reportes en la literatura que refieren una deficiencia de la apolipoproteína C-II, cuya función es activar la Lp lipasa.

El diagnóstico exacto de una hiperlipoproteinemia es importante, debido a los efectos que a largo plazo puede acarrear en el paciente en estudio. Uno de estos efectos es la aterosclerosis, proceso patológico de etiología múltiple, en cuyo desarrollo influyen numerosos factores endógenos y exógenos. Estos se conocen como factores de riesgo.

Integración del metabolismo lipoproteico.

El metabolismo de las Lp toma parte en tres funciones centrales. La primera, la absorción de las grasas de la alimentación; está mediada por el sistema de QM. Los residuos de QM, el producto final de este sistema, son eliminados por el hígado. El receptor de los residuos de QM, también denominado receptor de apo E, regula esta eliminación.

La segunda función, el transporte de lípidos desde el hígado a los otros tejidos corporales, está regulada por el sistema VLDL. Las IDL, son un paso intermedio en este sistema, y las LDL son el producto final. El hígado elimina directamente algunas IDL, mientras que las LDL son eliminadas por el hígado y por tejidos extrahepáticos. Tanto la eliminación de las IDL como de las LDL está regulada por el mismo receptor, de LDL, también denominado

receptor apo B/E.

La tercera función es la de conducir de regreso al hígado el exceso de colesterol en plasma o en los tejidos extrahepáticos, para que pueda ser excretado por la bilis. Este paso está regulado por las HDL, que trabajan conjuntamente con el sistema VLDL. Una vez que las HDL eliminan el exceso de colesterol, lo transforman en CE. Algunas HDL van directamente al hígado. El resto del CE es transferido al sistema VLDL por acción de una transferasa lipídica. Posteriormente el colesterol es transportado hasta el hígado como parte de las IDL o de las LDL.

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis se realizó con la finalidad de buscar nuevos fármacos para el tratamiento de la hipercolesterolemia, para lo cual se probó el efecto de varios compuestos sobre la concentración de colesterol y otros lípidos *in vivo* e *in vitro*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

1. Dentro de los derivados de la cadena lateral de la diosgenina, que es transformada a pregnenolona, pueden ser obtenidos compuestos de 6 carbonos, o polímeros, que por su analogía estructural con el intermediario de la transformación de la HMG-CoA a mevalonato (fig 3) pueden poseer actividad inhibitoria de tipo competitivo, sobre la HMG-CoA reductasa, enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol.

2. El probar *in vitro* e *in vivo* su efecto sobre la colesterogénesis de la rata, medida por la incorporación de acetato y mevalonato marcados isotópicamente, a colesterol, permite saber si su acción, en caso de existir, puede explicarse cuando menos en parte por inhibición a nivel de la HMG-CoA reductasa.

3. Un resultado en el cual se observara inhibición de la incorporación de acetato a colesterol, habiendo a la vez incorporación aunque sea muy escasa de mevalonato a colesterol, haría suponer que el efecto inhibitorio del compuesto es sobre la HMG-CoA reductasa, lo cual se puede confirmar midiendo la actividad

de esta enzima en un sistema de microsomas de hígado, obtenidos de ratas tratadas con dicho compuesto.

OBJETIVOS:

1. Investigar si existe actividad inhibitoria sobre la colesterogénesis en el hígado de la rata, al emplear el HMVA y MPS *in vivo* e *in vitro*

2. Valorar el efecto directamente sobre la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en el caso de haber efecto de inhibición en la incorporación de acetato a colesterol, acompañada de inhibición moderada o ausente en la incorporación de mevalonato a colesterol.

3. Determinar el efecto del HMVA y MPS en los niveles de colesterol, y triacilglicéridos séricos.

MATERIALES Y METODOS.

Compuestos probados experimentalmente en este trabajo de tesis.

a) La sal sódica del ácido 4-metil-4-pentenoico (MPS).

b) La sal sódica del ácido 4-metil-5-hidroxi-valérico (HMVA)

(fig 1) donados amablemente por el Dr. Giral y colaboradores (Facultad de Química, UNAM).

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 120 a 150 g de peso. Las ratas se colocaron en una habitación especial con temperatura y luz controladas, teniendo 15

horas de luz por 9 de obscuridad y condiciones adecuadas de aseo; se les suministró purina comercial como dieta de mantenimiento (Lab Chow) y agua *ad libitum*.

Reactivos marcados con isótopos radioactivos.

Acetato de sodio $1\text{-}^{14}\text{C}$ (actividad específica de $2.1 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$; ácido 3-hidroxi, 3-metilglutárico $3\text{-}^{14}\text{C}$ (actividad específica $13.4 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$); DL-mevalonolactona $2\text{-}^3\text{H}$ (actividad específica $82 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$).

Medición de la colesterogénesis *in vitro*.

Para medir la síntesis de colesterol *in vitro*, se utilizó el hígado de ratas que habían estado sin alimento, durante un mínimo de dos horas antes del sacrificio. Fueron sacrificadas por decapitación, aprovechando el momento para recibir la sangre en tubos de centrifuga y así obtener el suero sanguíneo para hacer diversas determinaciones. Los hígados de las ratas fueron obtenidos inmediatamente y se cortaron rebanadas de 1.0 mm de grosor, utilizando un microtomo, Tissue Slicer Stadie-Riggs, Thomas A. Company, No. 6727-C10.

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocaron 200 mg de hígado en rebanadas, añadiendo 2.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos de Krebs 0.2M, pH 7.4; $10 \mu\text{Ci}$ de acetato $1\text{-}^{14}\text{C}$ y $2 \mu\text{Ci}$ de mevalonato $2\text{-}^3\text{H}$.

El compuesto (HMVA o MPS), se añadió disuelto en la solución amortiguadora de fosfatos de Krebs, ajustando previamente el pH a

7.4; la incubación se hizo en un baño con agitación tipo Dubnoff, a 120 ciclos por minuto, durante dos horas, a 37°C y atmósfera con 95% de oxígeno y 5% de CO₂.

La reacción se detuvo añadiendo 3 ml de solución alcohólica de KOH al 33%, 5.0 ml de etanol al 96% y 5 mg de colesterol sin marca como acarreador. Los matraces se colocaron en un baño a 70°C durante dos horas para lograr la saponificación, controlando ésta por la desaparición de ésteres de colesterol en la cromatografía en capa fina de una alícuota del extracto.

Medición de la colesterogénesis in vivo.

Las ratas recibieron el derivado del ácido valérico por vía subcutánea o por vía oral, durante los días indicados en cada experimento, a la misma hora de la mañana. El último día los animales fueron sacrificados dos horas después de la administración del compuesto, recibiendo una hora antes de ser sacrificados 5 μ Ci de acetato 1-¹⁴C y 5 μ Ci de DL-mevalonato-2-³H por vía intraperitoneal, disueltos en solución amortiguadora de Krebs pH 7.4.

Las ratas fueron decapitadas; el hígado se obtuvo de inmediato del cual se tomó 1 g con el objeto de valorar el contenido de colesterol con el método descrito en seguida.

Extracción del colesterol del hígado.

Después de someter una muestra de 200 mg de hígado a saponificación, la fracción no saponificable fue extraída tres

veces con éter de petróleo (40 a 60°C) utilizando embudos de separación de 250 ml; los tres extractos etéreos fueron reunidos y se les lavó sucesivamente con solución salina y con agua destilada hasta eliminar los residuos de KOH. El extracto etéreo se evaporó a sequedad y fue recuperado con 3 ml de acetona etanol 1:1 (v/v); se añadió 1 ml de solución de digitonina al 1% en alcohol al 50%, dejándose reposar toda la noche. Se centrifugó y eliminó el sobrenadante; el precipitado fue resuspendido sucesivamente con 1.5 ml de etanol al 95% y 1.5 ml de etanol-éter etílico, 1:1, se secó el precipitado y el digitónido de colesterol se hidrolizó con piridina trasvasando el contenido del tubo de centrifuga a un vial, evaporándose la piridina colocando el frasco en un baño María a 70°C. dentro de una campana de extracción. Se añadieron varias veces volúmenes de 0.5 ml de tolueno hasta evaporar totalmente la piridina. Finalmente se agregó 1.5 ml de la mezcla para centelleo líquido; esta mezcla se preparó con 0.5 g de PPO (difeniloxasol) y 0.05 g de dimetil POPOP para 100 ml; se disolvieron estos componentes por separado con tolueno, y una vez disueltos, se mezclaron. La radiactividad fue medida en un espectrógrafo Packard Tricarb modelo 4322, corrigiendo el apagamiento con una curva de calibración hecha previamente.

Cromatografía en capa fina.

Se realizó empleando placas de gel de sílice G de 20 por 20 cm con 0.25 mm de grosor (Merck). El desarrollo de la cromatografía se hizo con éter de petróleo (40 a 60), éter etílico y ácido acético

glacial 85/15/3 (v/v). El revelado se hizo en una cámara con vapores de yodo.

Para la separación cromatográfica del mevalonato, se empleó una mezcla de acetona: benceno 1:1 (v/v) y el revelado se hizo con 2',7'-diclorofluoresceína al 0.2 % en metanol, observándose las manchas bajo luz ultravioleta.

Determinación de colesterol total.

El colesterol sérico fue determinado colorimétricamente con el método de Abell y colaboradores³⁰ que emplea anhídrido acético/ácido sulfúrico concentrado/ácido acético glacial 20:1:10 (v/v) para el desarrollo del color.

En un frasco con tapón esmerilado se coloca 0.5 ml de suero, inmediatamente se agrega 4.7 ml de etanol absoluto más 0.3 ml de KOH al 33%.

Se ponen los frascos en el baño Dubnoff 1 hora a 37°C y se deja enfriar.

La extracción se hace con 10 ml de éter de petróleo, poniendo también 5 ml de agua destilada, agitando un minuto en el vortex.

Se colocan en tubos de ensayo, volúmenes conocidos de la fase etérea.

Se evapora el éter de petróleo de 37 a 40°C, se colocan los tubos en baño maría a 25°C, hasta sequedad.

Se añaden a tiempos escalonados 6 ml de reactivo para desarrollo de color, el que se prepara de la siguiente manera: 1 parte de ácido sulfúrico, 20 partes de anhídrido acético, 10

partes de ácido acético glacial. Se poner el anhídrido en baño de hielo, luego se agrega el ácido sulfúrico y al final el ácido acético. Se saca del baño, se deja que tome temperatura ambiente y se agrega a los tubos. Posteriormente se lee usando filtro rojo 660 nm después de 30 minutos. El blanco es preparado utilizando únicamente el reactivo para el desarrollo de color.

Determinación de fosfoglicéridos.

Se determinó el fósforo de los extractos de lípidos del suero utilizando el método colorimétrico de Bauman¹¹, en el que se emplea para desarrollo del color una solución ácida de molibdato de amonio al 2.5%.

Se agrega en un tubo de ensayo 0.2 ml de suero más 4 ml de acetona-etanol 3:1; agitar por 30 segundos en el vortex, después dejar reposar por 5 minutos. Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos.

Tomar del sobrenadante 0.5 ml por duplicado. Evaporar a sequedad, Adicionar a cada tubo 0.4 ml de H₂SO₄ 10N.

Poner en el horno para digerir por 2 horas a 160°C. Agregar 6 gotas de H₂O₂ (30% vol). Dejar en el horno por 2 o más horas. Observar que haya quedado completamente transparente, de otro modo se le agrega más agua oxigenada y se regresa al horno.

Cuando el contenido del tubo está claro, se añade 1 ml de agua bidestilada y se pone a ebullición por 10 minutos. Se saca y se agregan 4 ml de agua bidestilada, 5 ml de una mezcla de molibdato de amonio al 2.5% y H₂SO₄ en cantidad suficiente para acidificar la solución (420 ml de agua bidestilada, 40 ml de molibdato de amonio

al 25% y 40 ml de H_2SO_4 10N y 0.2 ml de ácido ascórbico, mezclando bien). Posteriormente se colocan los tubos a ebullición durante 10 minutos y se enfrían en el chorro de agua. Finalmente se lee a 660 nm (filtro rojo).

Se preparan patrones de concentración conocida a partir de KH_2PO_4 , con 3,6, 12 y 18 μg de Pi, mismos que se ajustan a 5 ml con agua bidestilada antes de desarrollar color.

Valoración de triacilglicéridos.

Los valores de los triacilglicéridos en suero se determinaron empleando metaperyodato de sodio al 0.6% según el método colorimétrico descrito por Gottfried³¹.

Para preparar el metaperyodato se emplean 6 g/l incluyendo 50 ml de ácido acético glacial.

Reactivo de acetyl-acetona: 1.5 ml de acetyl-acetona se afora a 200 ml con acetato de amonio 2M. Se deja reposar 1 h antes de usarlo.

Para preparar los estándares de trioleína, se disuelve una ampollita de 500 mg (sigma T 7502) en 100 ml de isopropanol, quedando por lo tanto a una concentración de 5 g/l. Se hacen diluciones con isopropanol de tal modo que se obtengan las concentraciones de trabajo de 100, 200 y 300 mg/100 ml.

Para hacer la extracción de TAG en suero se agregan, a 0.5 ml de suero, 2 ml de heptano, 3.5 ml de isopropanol y 1 ml de ácido sulfúrico 0.8N; se mezcla en el vortex 30 seg y se deja que las fases se separen, sin centrifugación.

A 0.4 ml de la fase superior, de heptano, se añaden 2 ml de isopropanol y una gota de KOH (6.25M). Se mezcla bien y se incuba a 70°C por 10 min. Se adicionan 0.2 ml del reactivo de metaperyodato y 1 ml de reactivo de acetilacetona. Se mezcla bien y se incuba a 70°C por 10 min. Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente antes de leer a una longitud de onda de 425 nm (filtro azul) estando aun tibia la solución.

La curva de calibración con este método es lineal hasta 200 mg/dl y la recuperación promedio es de 94.5%; los valores normales en el humano, después de 10 h de ayuno, son de 42-167 mg/dl.

Separación electroforética de lipoproteínas.

Se usó el método de acetato de celulosa gelatinizado de Herr, Margani A.³³.

Sobre las tiras de celulosa se deposita el suero que va a ser sometido a un campo eléctrico, en condiciones que separan las distintas lipoproteínas. La tinción de dichas lipoproteínas, con un colorante de lípidos, permite la evaluación porcentual de las fracciones separadas.

La separación electroforética se realizó en membranas de celogel de 2.5 por 17.5 cm.

Se lavan las tiras de celogel con la solución amortiguadora durante 10 minutos como mínimo, con objeto de eliminar el alcohol metílico en que vienen sumergidas, que podría desnaturalizar las proteínas.

La solución amortiguadora utilizada contenía: Tris/glicina/NaCl (14.1 g, 22.6 g y 1 g, respectivamente, para 1 litro de solución).

Se secan las tiras entre dos hojas de papel filtro para eliminar el exceso de amortiguador sobre la superficie, para evitar una distribución tortuosa del suero en el momento de ser aplicado.

Se marca el extremo de cada tira con lápiz de grafito para la identificación de las distintas muestras de suero en estudio. Se deposita en el centro de la tira, equidistante al ánodo y cátodo, 0.5 μ l de la muestra de suero en estudio. Se realizan tres aplicaciones sobre el mismo punto permitiendo que entre cada aplicación la muestra se absorba convenientemente; esto beneficia la separación de las fracciones lipoproteicas.

La fuente de poder se fija a 200 volts durante 40 minutos. Después del periodo de fraccionamiento, se sumergen las tiras durante 2h en la solución colorante, que contiene Fat 7B, preparado siguiendo las indicaciones del proveedor, minutos antes de finalizar el fraccionamiento eléctrico. Conviene agitar periódicamente durante el procedimiento de tinción.

Después de las 2 horas se lavan las tiras bajo una corriente de agua. El fondo de la tira queda perfectamente límpida, lo que contrasta con las bandas coloreadas de lipoproteinas. Posteriormente a las tiras se las coloca en la solución de transparencia durante 5 minutos; después se extienden sobre una placa de vidrio perfectamente limpia, escurriendo el exceso de líquido.

Con una lámpara de rayos infrarrojos o en una estufa a 70°C se

completa la transparencia durante 5 minutos.

A continuación las tiras se lavan rápidamente con agua destilada para eliminar el exceso de sal, secándose con papel filtro. Se conservan a temperatura ambiente. Cuando la tira se ha descargado de toda humedad está lista para cuantificarse, pudiendo ser conservada en esta forma.

Para hacer la valoración, se disponen 4 tubos marcados convenientemente, colocando en cada uno 1 ml de la solución eluyente de acetato de etilo/metanol 80:20 (v/v). Se recortan cada una de las fracciones y se colocan dentro del tubo correspondiente. Se esperan 20 minutos para que se libere el colorante fijado a las lipoproteínas y entonces se lee a 530 nm. En el tubo reservado para el blanco, se coloca un trozo de celogel de la misma tira, que no contenga lipoproteínas.

Valoración de la enzima 3 hidroxil, 3 metil-glutaril CoA reductasa.

Se realizó midiendo la transformación de hidroximetil glutaril CoA 3-¹⁴C a mevalonato, en un sistema en que se emplearon microsomas de hígado, siguiendo el procedimiento descrito por Ortíz²⁴. El sistema de valoración completo, contiene en un volumen de 0.8 ml:

Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2.....	100 mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂).....	3 mM
Fosfato de dinucleótido de	
adenina y nicotinamida, (NADP ⁺).....	3 mM
Glucosa 6-fosfato	10 mM

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	2.5 unidades
Glutati3n reducido.....	50 mM
3-hidroxi-3-metil glutaril coenzimaA 3- ¹⁴ C.....	0.2 mM
Proteína Microsomal	0.40 a 0.7 mg

La reacci3n se inicia por la adici3n de la enzima microsomal, despu3s de que ya se han a3adido todos los dem3s ingredientes de la mezcla de reacci3n.

Se coloc3 el sistema completo en tubos de 15 ml, por duplicado, incub3ndose durante 30 minutos en un ba3o Dubnoff, a 37°C, con agitati3n de 72 ciclos por minuto, en atm3sfera de aire.

Al terminar el tiempo de incubaci3n se a3adieron 3 mg de mevalonolactona no radiactiva (Sigma Chemical Co) disueltos en acetona, a cada uno de los tubos y la reacci3n se detuvo inmediatamente por la adici3n de 0.4 ml de 3cido sulf3rico 1N.

Los tubos se mantienen en agitati3n 30 minutos m3s, a 37°C, para estar seguros de la lactonizaci3n del mevalonato biosintetizado. Se deja que los tubos tengan temperatura ambiente y se adiciona a cada uno 0.5 ml de etanol absoluto y 1.0 g de sulfato de sodio anhidro.

La soluci3n se extrae 4 veces con 2.0 ml de 3ter etilico, libre de per3xidos, agitando 5 minutos en el vortex cada vez. Se juntan los 4 extractos et3reos, se secan utilizando sulfato de sodio anhidro y se evaporan en vasos de precipitado de 50 ml con una corriente de aire. El extracto se recupera con 3 ml de acetona y se toma una alicuota de 0.5 ml para aplicarla en placas de gel de siliice.

La cromatografía se hace utilizando placas de vidrio de 20 por 20 cm en las que se aplica una capa de gel de sílice, en la proporción de 15 g para 45 ml de agua destilada, suficiente para 5 placas; la suspensión se aplica utilizando un deslizador que deja una capa uniforme de aproximadamente 0.2 mm. Se dejan secar 30 minutos a temperatura ambiente antes de colocarlas en un horno a 125°C durante una hora. Se deja que tengan la temperatura ambiente antes de usarse. En caso de no utilizarlas de inmediato se guardan en un desecador. En la placa se colocan por duplicado, alícuotas de los extractos, aplicando también por separado y en la misma placa patrones de colesterol y mevalonato, que también están disueltos en acetona. El desarrollo de la cromatografía se hace utilizando una mezcla 1:1 de acetona:benceno V/V, tardando el desarrollo de la cromatografía aproximadamente 40 minutos. Las placas se sacan de la cámara de cromatografía, se dejan secar y se rocían con la mezcla reveladora que es una solución al 0.2% de 2',7'-diclorofluoresceína en metanol. Utilizando una lámpara de rayos ultravioleta se puede identificar fácilmente las manchas de los patrones y los problemas. La mancha correspondiente a mevalonato se raspa de la placa y se recoge el gel de sílice en un vial, agregando 15 ml de la mezcla centelladora.

Los R_f obtenidos con este sistema de cromatografía son los siguientes:

Hidroximetil glutárico	0.0
Mevalonolactona	0.7
Colesterol.....	0.9

La radiactividad fue medida en un espectrómetro de centelleo líquido packard Tricarb Modelo 4322.

En cada experimento se incluyó el procesamiento, desde los pasos de extracción en adelante, de un tubo conteniendo una cantidad conocida de mevalonolactona-2-¹⁴C, de tal modo de poder corregir los resultados por pérdidas durante el procedimiento de extracción. La recuperación promedio fue de 80%. Los resultados se expresan como nanomoles de hidroximetilglutaril coenzima A convertidos a mevalonato por minuto, por miligramo de proteína microsomal³⁴.

Determinación de proteínas.

La proteína microsomal fue determinada colorimétricamente empleando el reactivo de Folin, según lo describe Hartree³⁵

Técnica para aislar colesterol del sistema nervioso central.

Primero se procede a extraer la masa encefálica de la rata. Utilizando una pinza se separan hipotálamo, cerebelo y cerebro. Cada uno de ellos se pesa, se homogeneiza manualmente con un homogenizador tipo Elvehjem, después de adicionar una mezcla de cloroformo metanol 2:1, dejándose extraer hasta que el tejido sedimente; se filtra con papel Whatman del número 3 y el extracto se evapora a sequedad. Posteriormente se determina colesterol total con la técnica descrita por Abell³⁰.

Evaluación de la colesterogénesis en el sistema nervioso central de ratas tratadas con el compuesto MPS a partir de precursores marcados.

De acuerdo al procedimiento descrito por Díaz-Zagoya, y col³⁶, se emplean ratas a las que se administró por vía subcutánea el MPS. De acuerdo al esquema del experimento, fueron sacrificadas y se obtuvieron: cerebro, cerebelo e hipotálamo. Se pesan y se colocan en matraces Erlenmeyer de 25 ml a los cuales se les agrega 2.5 ml de solución amortiguadora de Krebs, pH 7.4, sin fosfatos. Esta solución amortiguadora se prepara en el momento del experimento de la siguiente manera: 100 partes de NaCl (0.154 M), 4 partes de KCl (0.154 M), 3 partes de CaCl₂ (0.11 M) y 1 parte de MgSO₄.7 H₂O (0.154 M).

Se tritura el tejido manualmente con una varilla de vidrio y se agrega el precursor (acetato o mevalonato marcados). El precursor utilizado tenía la actividad de 10 μ Ci/ml. La técnica para el aislamiento y medición del colesterol ha sido descrita por Díaz-Zagoya³⁴). Descrita en forma breve incluye los siguientes pasos:

Las muestras se ponen en el agitador Dubnoff, a 120 ciclos/minuto, por 2 horas, con atmósfera de oxígeno, a 37°C. Después de la incubación se para la reacción adicionando 0.5 ml de KOH al 30% y 10 mg de colesterol frío disuelto en etanol; se completa el volumen a 5 ml con etanol. Se saponifica a 70°C durante 2 horas y se refrigera por 12 h.

Extracción del colesterol. Se realizó tres veces en embudos de separación, con éter de petróleo, empleando volúmenes de 30 ml; los extractos ya reunidos se lavaron la primera vez con solución salina saturada (NaCl) y dos veces con agua destilada.

Se evaporó el extracto y se recobró empleando 1.5 ml de acetona-etanol 1:1, por tres ocasiones, pasando la muestra a un tubo de centrifuga.

Se precipitó con digitonina al 1% disuelta en etanol al 50%.

Se centrifugó sucesivamente y resuspender el precipitado con etanol, etanol-éter 2:1, y finalmente con éter. El precipitado se evapora con una lámpara de rayos infrarojos. Posteriormente, se disolvió en piridina y se pasó a un vial, evaporando la piridina en un baño a 50°C. Después se agregó 1 ml de tolueno y se evaporó. Finalmente se agregaron 15 ml de centellador que había sido preparado con 10 g de PPO, 1 g de dimetil POPOP en 2 litros de tolueno. La medición de la actividad se realizó en condiciones para ^{14}C , para ^3H o para ambos.

RESULTADOS.

1. Valoración del efecto del HMVA en el metabolismo del colesterol de la rata.

a) La medición de la colesterogénesis *in vitro* se hizo por la incorporación de acetato y mevalonato marcados, a colesterol, en rebanadas de hígado de rata. En la figura 6 se observa que hubo inhibición de la incorporación de ambos precursores, sin embargo el efecto fue mayor sobre la incorporación de acetato, en todas las dosis utilizadas (0 a 52 mM).

b) La valoración de la colesterogénesis *in vivo* se realizó exclusivamente midiendo la incorporación de acetato a colesterol en hígado, utilizando diversas dosis, la mayor fue de 1.95 mmoles/100 g de peso. En la figura 7 se aprecia que con 0.32 mmoles de HMVA/100 g de peso se obtiene un 20% de inhibición de la incorporación del precursor y con dosis de 0.97 a 1.95 mmoles/100 g de peso, se obtuvo el máximo de inhibición (60%).

c) Se midió la colesterogénesis *in vivo*, en el hígado de ratas que recibieron HMVA por vía oral (Tabla 1), a una dosis de 1.88 mmoles/100 g peso. corporal (grupo 2), y se comparó con la de ratas normales (grupo 1), con dieta adicionada de 1% de colesterol (grupo 3), con dieta adicionada de 1% de colesterol y HMVA (grupo 4) tratadas con diosgenina (grupo 5) o tratadas con diosgenina y HMVA (grupo 6). En la tabla 1 se puede ver que el HMVA inhibió la

% Incorporación

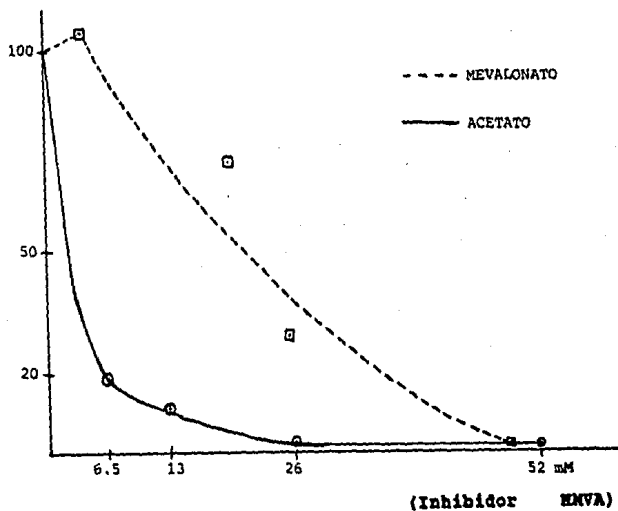
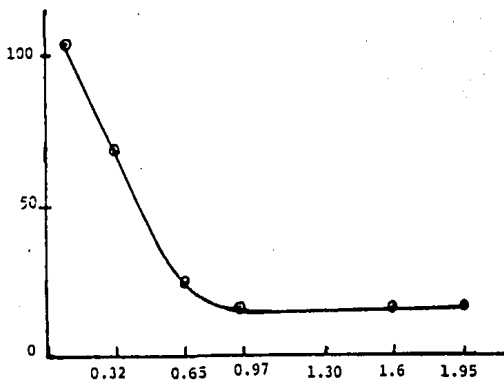


FIGURA 6. EFECTO DEL HMVA EN LA INCORPORACION IN VITRO DE ACETATO Y MEVALONATO MARCADOS A COLESTEROL, EN REBANADAS DE HIGADO DE RATA

(Figura tomada de referencia 12)

% Incorporación



HMVA (nmoles/100 g de peso)

FIGURA 7. INCORPORACION IN VIVO DE ACETATO A COLESTEROL
EN HIGADO DE RATA EN PRESENCIA DE CANTIDADES
VARIABLES DE HMVA

(figura tomada de referencia 12)

TABLA 1

Incorporación *in vivo* de acetato radiactivo a colesterol en hígado de rata.

Grupo	nmol/g/h	p
1. Control (4)	1600± 50	
2. HMVA (4)	511± 87	< 0.001
3. 1% colesterol (4)	656± 241	< 0.01
4. 1% colesterol + HMVA (4)	386± 130	< 0.001
5. 1% diosgenina (4)	4624± 338	< 0.001
6. 1% diosgenina + HMVA (4)	2242± 432	> 0.10

Los animales recibieron las dietas indicadas por 6 días. Cuatro días antes de su sacrificio se les administró diariamente el HMVA, por vía oral, a una concentración de 1.8 mmoles/100 g de peso corporal. Una hora después recibieron 5 μ Ci/100 g de peso corporal de Acetato de sodio de actividad específica 0.166 mCi/mmol. Los resultados son expresados como nanomoles de acetato incorporados a colesterol por gramo de hígado por hora. El número de ratas de cada grupo se indica entre paréntesis.

TABLA 2

Actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado de ratas tratadas con HMVA y alimentadas con diosgenina o colesterol.

Grupo	Actividad de la HMG-CoA reductasa	
1. Control (9)	5.47± 0.52	
2. HMVA (4)	5.31± 0.28	p> 0.10
3. 1½ Diosgenina (10)	9.48± 3.68	p< 0.005
4. 1½ Colesterol (4)	2.15± 0.15	p< 0.005

Los animales indicados recibieron por cuatro días antes de ser sacrificados 1.88 mmoles/100 g de su peso corporal de HMVA disuelto en solución amortiguadora de fosfato pH=7.8 o sólo el equivalente del volumen del amortiguador de fosfato.

Los animales del grupo 3 y 4 recibieron las dietas indicadas 48 horas antes de su sacrificio. La actividad de la reductasa se expresa como nmoles de mevalonato formado por mg de proteína microsomal/hora. Cada animal fue valorado con 4 ensayos. El sistema de ensayo consistió de 0.8 ml que contenían: 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH= 7.2, 3 mM de Mg Cl₂, 3 mM de NADP, 10 mM de glucosa 6 fosfato, 2.5 unidades de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa, 50 mM de glutatión reducido, 0.2 mM (3-¹⁴C)-HMG-CoA y 0.7 a 0.9 mg de proteína microsomal. El número de ratas de cada grupo está indicado en el paréntesis, además la actividad muestra el error estandar del promedio.

incorporación de acetato a colesterol. Igualmente se produjo una inhibición por el exceso de colesterol en la dieta (grupo 3). El HMVA también manifestó su efecto inhibitorio en las ratas a las cuales se estimuló la incorporación de acetato a colesterol, administrando diosgenina en la dieta (comparar grupo 5 y 6).

d) Se midió la actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado de ratas normales (Tabla 2), tratadas con HMVA, con dieta rica en colesterol o con diosgenina administrada por vía oral. En la que se observa que los valores de actividad de la HMG-CoA reductasa son semejantes en las ratas normales y en las que recibieron HMVA. Por el contrario se observan los efectos ya reportados en la literatura, de inhibición e incremento de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, por el empleo de una dieta hipercolesterolémica y diosgenina, respectivamente.

2. Valoración del efecto del NPS sobre el metabolismo del colesterol en la rata.

a) Valoración de la colesterogénesis *in vitro* por la incorporación de acetato y mevalonato marcados a colesterol, en hígado de rata. En la figura 8 se observa que en todas las dosis utilizadas (0.77 a 260.6 μ moles/l) se produjo una importante inhibición de la incorporación de los dos precursores.

b) Valoración de la colesterogénesis *in vivo* por la incorporación de acetato y mevalonato a colesterol, en ratas tratadas con NPS. En la figura 9 se observa que en todas las dosis

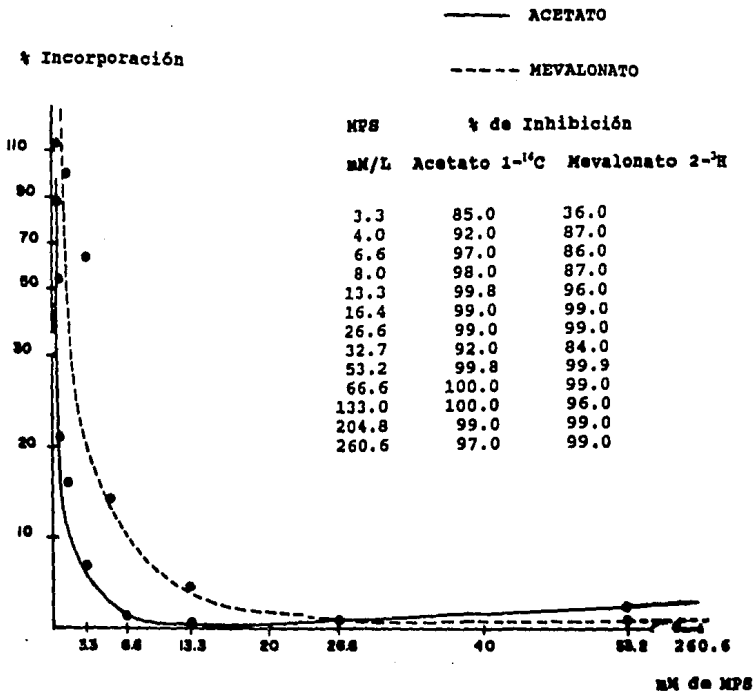
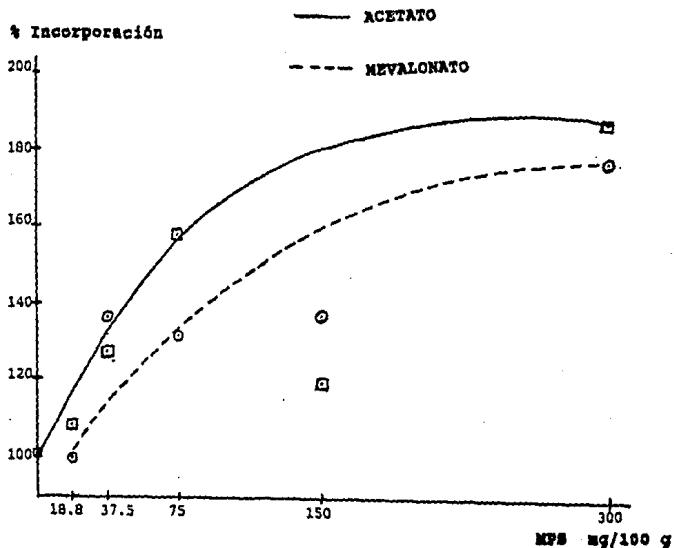


FIGURA 3. INCORPORACION IN VITRO DE ACETATO 1-¹⁴C
 Y MEVALONATO 2-³H A COLESTEROL EN REBAMADAS
 DE HIGADO DE RATA, EN PRESENCIA DE DOSIS
 VARIABLES DE MPS



% de Incorporación

MPS	Acetato 1- ¹⁴ C	Mevalonato 2- ³ H
300	166	177.2
150	119.6	136
75	157.6	132.6
37.5	127.8	137.7
18.8	109.5	100

FIGURA 9. Efecto del MPS sobre la incorporación in vivo de Acetato y Mevalonato marcados a colestrol, en hígado de rata. La incorporación basal para el Acetato 1-¹⁴C en ausencia de MPS, fue de 3640 dpm(100 %) y para Mevalonato 2-³H fue de 13875 dpm (100%).

de MPS utilizadas (0 a 300 mg/100 g de peso corporal), se produjo un incremento en la incorporación de ambos precursores.

c) Determinación de colesterol total en suero de ratas tratadas con MPS, por vía subcutánea. En la figura 10 se observa que con cada una de las dosis utilizadas (0 a 2.1 mmoles/100 g de peso corporal) se produjo efecto hipocolesterolemiante.

d) Estudio de los niveles plasmáticos de triacilgliceroles en ratas tratadas con 0.064 mmoles de MPS/100 g de peso corporal. En la figura 11, se aprecia una disminución importante de los niveles de TAG en las ratas que recibieron MPS por vía subcutánea.

e) Análisis de las lipoproteínas y fosfolípidos en suero. En las ratas tratadas con MPS no se encontró modificación, con respecto al grupo control, ni en las lipoproteínas, ni en los fosfolípidos del suero. (Por esta razón los datos no se incluyeron)

f) Análisis del efecto del MPS, en el sistema nervioso central de la rata administrado por vía intraperitoneal, en la figura 12, se observa que no hubo diferencias entre las ratas tratadas con MPS y las ratas control, en la incorporación de mevalonato a colesterol en cerebro. Por el contrario sí hubo diferencias en la incorporación de mevalonato a colesterol en cerebelo e hipotálamo, con incremento e inhibición, en estas dos regiones del SNC de las ratas tratadas con MPS, respectivamente. Este estudio no está señalado en los objetivos, sin embargo fue posible hacerlo gracias a la colaboración del Dr. Ricardo Martínez Vargas.

COLESTEROL EN SUERO DE RATAS TRATADAS CON 4 METIL-4 PENTENOATO DE SODIO.

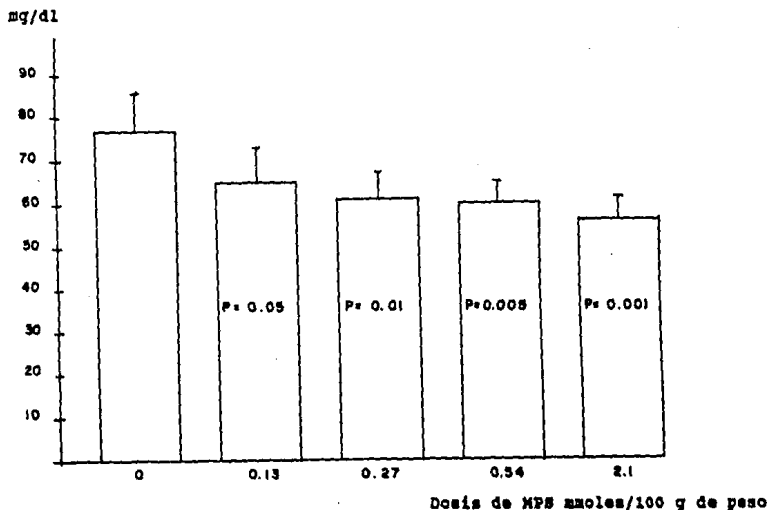


FIGURA 10. Se utilizaron ratas machos de 150 a 160 g de peso con un periodo de ayuno de dos horas. El MPS se administró a las dosis indicadas por vía subcutánea durante cuatro días. Cada grupo que recibió MPS se comparó con el grupo control; los valores de p se indican en cada caso, a partir de la dosis de 0.27 sus valores disminuyeron significativamente.

TRIACILGLICEROLES SERICOS EN RATAS TRATADAS CON M P S

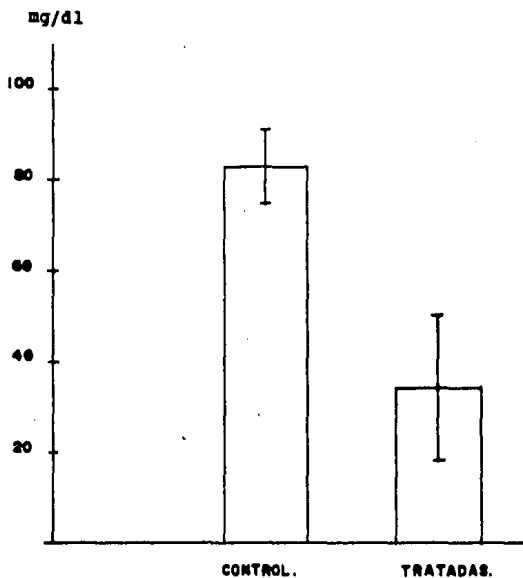
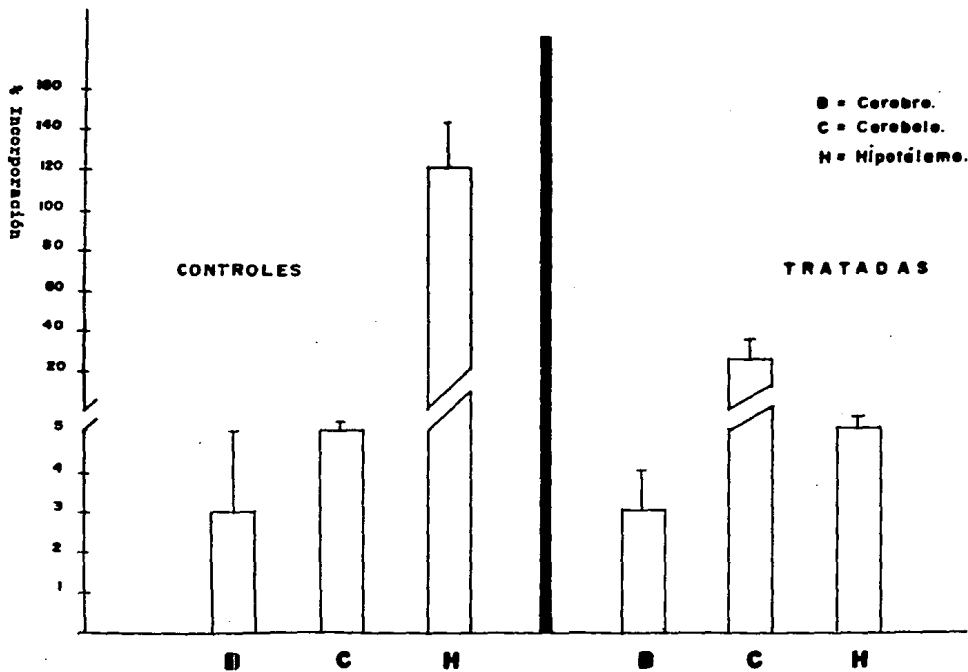


FIGURA 11. EL MPS SE ADMINISTRÓ A LA DOSIS DE 0.064
mmoles/100 g DE PESO CORPORAL, POR VÍA SUBCUTÁNEA
DURANTE 4 DÍAS.

FIGURA 12. INCORPORACION DE MEVALONATO 2-N³ A COLESTEROL EN EL S.N.C. DE RATA WISTAR



DISCUSION

Efecto del HMVA sobre la colesterogénesis *in vitro*.

El primer derivado del ácido valérico que se utilizó fue el HMVA del cual ya ha sido comunicado su efecto hipocolesterolemiant¹².

Los resultados de nuestros experimentos indican que el compuesto inhibe la incorporación *in vitro* tanto de acetato como de mevalonato a colesterol, en el hígado de la rata, como se muestra en la figura 6. Los resultados representan la radiactividad en el colesterol de 200 mg de rebanadas, expresada como el porcentaje del valor control: 14,061 ± 2,413 dpm/200 mg de rebanadas de hígado y 112,121 ± 16,758 dpm/200 mg de rebanadas de hígado para el acetato y mevalonato, respectivamente. El efecto inhibitorio del HMVA fue dependiente de la dosis pero para el caso del mevalonato las mismas dosis de HMVA produjeron menor grado de inhibición que para el acetato, con excepción de las dosis mayores a 50 mM, figura 6.

Una inhibición mayor de la incorporación de acetato que de mevalonato a colesterol abre la posibilidad de que el efecto del HMVA sea sobre la enzima HMG-CoA reductasa, razón por la cual esta enzima fue medida.

Efecto del HMVA sobre la colesterogénesis *in vivo*.

Cuando se administró el HMVA a la rata, por vía parenteral, a dosis de 0 a 1 mmoles/100 g de peso corporal, no presentó efecto sobre la incorporación de acetato a colesterol (los datos no se incluyen), sin embargo cuando el compuesto se administró por vía oral, tuvo

una influencia crítica sobre la síntesis de colesterol, valorada por la incorporación de acetato a colesterol en el hígado (fig 7). La curva de dosis-respuesta muestra que se obtiene un 20% de inhibición de la incorporación con dosis de 0.32 mmoles/100 g de peso corporal.

El máximo de inhibición fue obtenido con dosis en el intervalo de 0.97 a 1.95 mmoles/100 g de peso corporal, figura 7. Es muy interesante que dosis bajas del orden de 0.072 mmoles/100 g de peso corporal produjeron aumento en la incorporación de acetato a colesterol, esto es un efecto opuesto al de las dosis mayores de HMVA. Este resultado no se puede explicar con los datos aportados por nuestros experimentos.

Tomando en consideración los datos anteriores, se escogió una dosis de 1.88 mmoles de HMVA/100 g de peso corporal para ser administrada por vía oral a las ratas. Esta dosis produce un 60% de inhibición en la incorporación de acetato a colesterol Tabla 1 y un 30% de inhibición de mevalonato a colesterol ($84,277 \pm 5,280$ dpm vs $57,253 \pm 87$ dpm por g de hígado fresco, en las ratas control y en las tratadas con HMVA, respectivamente, $p < 0.05$). El colesterol del suero en las ratas tratadas con HMVA fue de 84.8 ± 4.1 mg/dl vs 88.6 ± 5.8 mg/dl en el grupo control ($p > 0.10$). Tomado de referencia¹²

El contenido de colesterol en el hígado de las ratas tratadas con HMVA fue semejante al de las ratas control (265 ± 17 mg/100 g vs 260 ± 4 mg/100 g de hígado fresco en el grupo control). Por el contrario en las ratas que recibieron 1% de colesterol en la dieta, el contenido de colesterol hepático mostró un incremento del 8%. En

la tabla 1 se muestra que la administración oral de HMVA produjo un 69% de inhibición en la incorporación de acetato a colesterol, tan importante como la que produjo la administración durante dos días de una dieta con 1% de colesterol más 0.5% de desoxicolato de sodio (60% de inhibición). La administración de HMVA a ratas con dieta rica en colesterol produjo una inhibición del 77%; las ratas tratadas con diosgenina mostraron incremento en la incorporación de acetato (289%), lo cual concuerda con datos previos reportados por nuestro laboratorio¹². La administración de HMVA a ratas tratadas con diosgenina revertió parcialmente el efecto de la diosgenina. Estos resultados apoyan que el efecto del HMVA es a lo menos en parte debido a la acción sobre la HMG-CoA reductasa, aunque el hecho de que exista también inhibición de la incorporación de mevalonato a colesterol indica que hay otros sitios o mecanismos de acción del HMVA sobre la biosíntesis del colesterol. Nuestros experimentos no nos permiten decir dónde o cómo es dicho efecto.

La medición de la HMG-CoA reductasa en microsomas de hígado de rata (tabla 2) muestra que la actividad de la enzima en las ratas que recibieron 1.88 mmoles de HMVA/100 g de peso corporal no es diferente de la actividad enzimática de las ratas normales. Por el contrario, sí hay efecto estimulador, moderado, estadísticamente significativo, sobre la actividad enzimática, por la administración de diosgenina, al igual que un efecto inhibitorio por la administración de una dieta rica en colesterol, esto último en concordancia con reportes previos de la literatura.

Estos resultados (tabla 1) indican que el efecto del HMVA es

sobre todo por mecanismos distintos a la modificación de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, mismos que no podemos identificar con los resultados de nuestros experimentos.

Existen varias posibilidades para explicar el mecanismo del efecto del HMVA:

- 1^o. Que el efecto inhibitorio sea sobre un paso de la vía biosintética del colesterol posterior al catalizado por la HMG-CoA reductasa. Esto explicaría también la disminución en la incorporación de mevalonato.
- 2^o. Que se produzcan cambios en la poza de acetato, en este caso una disminución. La disminución de la poza de acetato se podría manifestar también en otras vías dependientes de unidades de acetilo.
- 3^o. También existe la posibilidad de que el acetato pudiera ser tomado por otras vías biosintéticas y que la disminución de la poza fuera reflejada en la disminución de la colesterogénesis, así como en la disminución de la lipogénesis.
- 4^o. El HMVA afectó la incorporación de acetato y mevalonato. Es posible que la inhibición de la síntesis de colesterol se compense por cambios en absorción o secreción biliar, receptores de LDL, síntesis de ácidos biliares o bien a un incremento en la colesterogénesis extrahepática.
- 5^o. El que no haya cambio en la HMG-CoA reductasa en microsomas, quizá sea por lavar el HMVA al preparar los microsomas.

Efecto del MPS sobre la colesterogénesis *in vitro*.

La medición de la biosíntesis de colesterol se hizo por la valoración de la incorporación de acetato y mevalonato a colesterol, en rebanadas de hígado de rata, siendo este efecto directamente proporcional a la dosis utilizada. El MPS se adicionó a dosis de 0 a 124 μ moles/litro. En la figura 8 se observa que el MPS produjo inhibición de la incorporación de ambos precursores. La acción fue más aparente sobre la incorporación de acetato a colesterol donde se produce el 90% de inhibición de la incorporación con una concentración de 2.7 mM.

Por el contrario, el mismo porcentaje de inhibición sobre la incorporación de mevalonato marcado al colesterol (fig 8) solamente se obtiene con una concentración de MPS de 8.1 mM. Después de 26.6 mM la inhibición es prácticamente total sobre la incorporación de acetato y mevalonato a colesterol. La diferencia en la inhibición de la incorporación entre acetato y mevalonato es muy pequeña, menor que la observada en el caso del HMVA. Este resultado indica que es muy poco probable que dicho efecto inhibitorio sea sobre la HMG-CoA reductasa, razón por la que no se hizo la medición de dicha enzima en los microsomas de hígado.

Efecto del MPS sobre la colesterogénesis *in vivo*.

Al probar el efecto del MPS *in vivo* en el hígado de la rata, se administró el compuesto, por vía subcutánea, en dosis que variaron desde 0 a 300 mg/ 100 g de peso corporal. En la figura 9 puede observarse que para los dos precursores, en todas las

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

utilizadas de MPS, se produjo un incremento en su incorporación a colesterol en el hígado. Este efecto fue mayor para el acetato que para el mevalonato. No es posible explicar el contraste de los resultados *in vitro* con los obtenidos *in vivo*, con los experimentos realizados en esta tesis.

Cuando se empleó MPS por vía subcutánea, en dosis de 0 a 156 mg/100 g de peso corporal, (0 a 2.1 mmoles) se observó figura 10 el descenso moderado pero significativo en los niveles de colesterol plasmático, con todas las dosis utilizadas.

Cuando se empleó el MPS en dosis de 10 mg/100 g de peso corporal, por vía subcutánea figura 11, los niveles de TAG en plasma sanguíneo disminuyeron en el grupo tratado, comparativamente con las ratas normales. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

La incorporación de mevalonato marcado a colesterol en el SNC, en las ratas que recibieron MPS por vía subcutánea durante cuatro días, 10 mg/100 g peso corporal, indica que, en las ratas normales, la colesterogénesis en el SNC fue heterogénea (fig 12). Sin embargo, los datos indican que el cerebro tuvo una incorporación semejante en los dos grupos de ratas, no ocurriendo lo mismo en el cerebelo donde las ratas tratadas con MPS tuvieron 4 tantos más de incorporación que las ratas control, y en el hipotálamo donde las ratas con MPS incorporaron sólo el 5% de lo encontrado en las ratas normales. En vista de que sólo se hizo un experimento, no es posible obtener conclusiones firmes, debiendo ser señalado únicamente que la colesterogénesis en el SNC también es

heterogénea, como en las ratas normales, con un efecto inhibitorio sobre la colesterogénesis en hipotálamo que es la zona del SNC que presenta aparentemente un recambio de colesterol más elevado.

CONCLUSIONES

En este trabajo reportamos los resultados del efecto de los derivados del ácido valérico: las sales sódicas del ácido 4-metil-5-hidroxisalicílico (HMVA) y del 4-metil-4-pentenoico (MPS), como posibles agentes hipocolesterolemiantes. Estos derivados al igual que otros reportados en la literatura presentan efectos sobre el metabolismo del colesterol cuando son empleados oralmente o por vía parenteral.

El HMVA inhibe la síntesis de colesterol tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

El MPS inhibe la colesterogénesis *in vitro* aunque si aumenta la colesterogénesis *in vivo*.

El MPS reduce moderadamente los niveles de colesterol y de triacilglicéridos.

Nuestros resultados no nos permiten localizar el efecto a nivel molecular, aunque si descartan el que éste sea sobre la enzima HMG-CoA reductasa, que es la enzima que se conoce como reguladora de la velocidad de biosíntesis de colesterol en el hígado.

Tomando en consideración que este tipo de derivados del ácido valérico se han obtenido como productos colaterales, en la síntesis química de pregnenolona a partir de diosgenina, y que todos estos compuestos, dentro de los cuales existen potencialmente agentes hipolipemiantes, son desechados sistemáticamente, creemos que es de suma importancia proseguir la búsqueda de agentes farmacológicos que pudieran ser inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa.

REFERENCIAS

1. Altschul R, Hoffer A and Stephen JD. *Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man.* Arch Biochem Biophys. 1955; 54: 558-59.
2. Tennet DM, Siegel H, Zanetti ME, Kuron GW, Ott WH and Walf FJ. *Plasma cholesterol lowering action of bile acid binding polymers in experimental animals.* J Lipid Res. 1960; 1: 469-73.
3. Thorp JM and Waring WS. *Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutirate.* Nature 1962; 194: 948-949.
4. Goldsmith GA, Hamilton JG and Miller ON. *Lowering of serum lipid concentrations. Mechanisms used by unsaturated fats, nicotinic acid and neomycin: excretion of sterols and bile acids.* Arch Intern Med. 1960; 105: 512-17.
5. Díaz Zagoya JC, Laguna García J and Guzmán García J. *Studies on the regulation of cholesterol metabolism by the use of the structural analogue diosgenin.* Biochem Pharmacol. 1971; 20: 3473-80.

6. Juárez-Oropeza MA, Díaz-Zagoya JC and Rabinowitz JL. *In vivo and in vitro studies of hypocholesterolemic effects of diosgenin in rats.* Int J Biochem. 1987; 19 : 679-83.
7. Hollander W and Chovanian A. *Effects of an inhibitor of cholesterol biosynthesis, triparanol (MER-25) in subjects with and without coronary artery disease.* Boston Med Quart. 1959; 10: 37-44.
8. Starr P, Roen P, Freibrun JL and Schleissner LA. *Reduction of serum cholesterol by sodium D-Thyroxine.* Arch Intern Med. 1960; 105: 830-42.
9. Díaz-Zagoya JC, Juárez Oropeza MA and Mandoki JJ. *Alteration of cholesterol synthesis in rat liver as induced by estradiol-17 β .* VII International Biophysics Congress and III Panamerican Biochemistry Congress. Mexico City, August 23 a 28, 1981: Abstracts pp 313.
10. Endo A. and Kuroda. *The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors.* J Lipid Res. 1992; 33: 1569-82.
11. Tanzawa K, Kuroda M and Endo A. *Time-dependent, irreversible inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by the antibiotic citrinin.* Biochem Biophys Acta. 1977; 488: 97-101.

12. Díaz Zagoya JC, Hurtado ME and González J. *Alteration of Cholesterol Synthesis in Rat Liver as Induced by 4-methyl-5-hidroxy Valeric Acid*. *Experientia*. 1976; 32: 1138-39.
13. Blankenhorn DH, Sharon A, Nessim, Ruth L, Jhonson RD, Miguel E, San Marco, Stanley P. *Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts*. *JAMA*. 1987; 257: 3233-3240.
14. Huff M W y col. *Mevinolin and cholestyramine inhibit the direct synthesis of low density lipoprotein apolipoprotein B in miniature pigs*. *J Lipid Res*. 1985; 26: 1175-1185.
15. Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF and Dodge HT. *Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B*. *N Engl. J Med*. 1990; 323: 1289-98.
16. Ruberfire M, James J, Macie, Roger D, Blevins P, Oringer C, Lester K, Rosman H. *The effect of pravastatin on plasma lipoprotein and apolipoprotein levels in primary hipercholesterolemia*. *Arch Intern Med*. 1991; 151: 2234-40.

17. Boccuzzi SJ, Bocanegra TS, Walker JF. *Long-term safety and efficacy profile of simvastatin*. Am J Cardiol. 1991; 68: 1127-1131.
18. Molgaard J, Lundh B, Schencklt, Olsson A. *Long-Term efficacy and safety of simvastatin alone and in combination therapy in treatment of hypercholesterolemia*. Atherosclerosis. 1991; 91: S21-S28.
19. Mabuchi H, Haba T, Tatami R, Miyamoto S, Sakai Y, Wakasugi T, Watanabe A, Koisumi MD. *Effects of an inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia* N Engl J Med. 1981; 305:478-482.
20. Cantu-Brito C y Rodríguez-Saldaña J. *Factores de riesgo de enfermedad vascular cerebral*. Ponencia del primer curso Internacional sobre factores de riesgo cardiovascular, Fac Med Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. Mayo 26 a 28, 1994.
21. Marcus AJ and Hajjar DP. *Vascular transcellular signaling*. J Lipid Res. 1993; 34: 2017-31.
22. Díaz-Zagoya JC y Rivera-Hidalgo P. *Metabolismo del*

- colecsterol. En Bioquímica e Inmunología. Díaz-Zagoya JC y Hicks Gómez JJ, Pub. Fac. Med. Universidad Nacional Autónoma de México, Edit. Piensa, México, D.F. 1988, pp. 429-445.
23. Díaz-Zagoya JC, Castañeda-Adriano H y Ramírez-Robles S. *El metabolismo del colecsterol. Estudio de un caso de hiperbetalipoproteinemia familiar.* En Temas Bioquímicos de Actualidad. Editores E Piña, A Peña, V Chagoya y J Martuschelli, Pub. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1978, pp. 15-29.
24. Juárez Oropeza MA. Mensaje Bioquímico. *Colesterol: De la Biología Celular a la Biología Molecular.* XV Taller de actualización Bioquímica. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. Vol XI 1988 pp. 79-143.
25. Devlin TM. *Biosíntesis del Colecsterol.* En Bioquímica. 2a ed., Edit. Reverté, S.A., Barcelona, 1991 pp. 508-20.
26. Stryer L. *Biosíntesis del colecsterol.* En Bioquímica 2a ed., Ed. Reverté, S.A., Barcelona, 1982. pp. 427-37.
27. Juárez Oropeza MA y Quiróz Martínez A. *Lipoproteínas* En Bioquímica e Inmunología. Díaz-Zagoya JC y Hicks Gómez

- JJ, Pub. Fac. Med. Universidad Nacional Autónoma de México, Edit. Piensa, México, D.F. 1988: pp. 311-335.
28. Montgomery R, Conway T y Spector A. *Lipoproteínas*. En *Bioquímica* 5a ed., Edit. Mosby-Year Book Wolfe Publishing. 1993. pp. 657-90.
 29. Donald S, and Fredrickson MD. *Phenotyping*. *Circulation*. 1993; 87(4) S-III: S1-S13.
 30. Abell LL, Levy BB, Brodie BB and Kendall FE. *A Simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity*. *J Biol Chem*. 1952; 195: 357-66.
 31. Bauman EJ. *On the estimation of organic phosphorus*. *J Biol Chem*. 1924; 59: 667-74.
 32. Gottfried SP, Rosenberg B. *Improved manual Spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides*. *Clin Chem*. 1973; 19: 1077-78.
 33. Herr E, y Margani A. *Identificación de Lipoproteínas en Acetato de Celulosa*. En *Electro e Inmunolectroforesis*. Edit. Trillas, Buenos Aires Argentina, 1972 pp 143-152.

34. Ortiz GI. *Valoración de la actividad de la enzima 3-hidroxi, 3-metil-glutaril CoA reductasa en el hígado de ratas tratadas con diosgenina.* Tesis profesional Departamento de Biología Fac de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México. 1974. 35.
35. Hartree EF. *Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response.* Analytical Biochemistry. 1972; 48: 422-27.
36. Díaz-Zagoya JC, Martínez-Vargas R and Martínez Montes F. *Sex differences of myelination in the rat and the effect of diosgenin on this process.* International Symposium on Function and Biosynthesis of Lipids. Sierra de la Ventana, Argentina. Nov 1976; pp 29-30.
37. Levy RI, August J, Troendle and Fattu JM. *A Quarter Century of Drug Treatment of Dislipoproteinemia, With a Focus on the New HMG-CoA Reductase Inhibitor Fluvastatin.* Circulation. 1993; 87: Suppl: III-45 To III-59.
38. Hiroshi M y col. *Effects of an inhibitor of 3 hidroxi-3 methylglutaryl coenzyme a reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hipercholesterolemia* N Engl J Med. 1981; 305: 478-482.