

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL CLOFIBRATO Y
DEL ACIDO CLOFIBRICO SOBRE EL CONTENIDO DE
VIMENTINA Y DESMINA DEL CITOESQUELETO DE
MIOCARDIOCITOS DE RATA**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTADO POR

M. en C. ADRIANA SAMPAYO REYES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEX. OCT. 1998

M. en C. ADRIANA SAMPAYO REYES

TD
RM666
.C548
S2
1998
c.1

1998



1080087051

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO**



**EFFECTOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL CLOFIBRATO Y DEL ACIDO CLOFIBRICO
SOBRE EL CONTENIDO DE VIMENTINA Y DESMINA DEL CITOESQUELETO DE
MIOCARDIOCITOS DE RATA.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTADA POR

M. en C. ADRIANA SAMPAYO REYES

San Nicolás de los Garza Nuevo León, México, Octubre de 1998

TD

RM666

.C548

S2

1998



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO**

**EFFECTOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL CLOFIBRATO Y DEL ACIDO
CLOFIBRICO SOBRE EL CONTENIDO DE VIMENTINA Y DESMINA
DEL CITOESQUELETO DE MIOCARDIOCITOS DE RATA.**


**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

POR

***M. en C.* ADRIANA SAMPAYO REYES**

COMISION DE TESIS


Dr. Salvador L. Saíd y Fernández
Director interno


Dr. G. Antonio Morales Aguilera
Director externo


Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón
Secretario


Dr. Mario R. Morales Vallarta
Vocal


Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Vocal


Dr. Mohammed Badii
Vocal

**EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PRESENTE
TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN:**

- **LABORATORIO DE FARMACOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DEL NORESTE, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO.**
- **UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.**
- **FINANCIADO PARCIALMENTE POR CONACYT (CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA).**

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S. y a todo el personal por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Ph D. Gerardo Antonio Morales Aguilera quien ha sabido impulsarme e involucrarme en el mundo científico.

Al Dr. Salvador L. Saíd Fernández que con sus valiosas enseñanzas y entusiasmo me han motivado a seguir adelante y superarme cada vez más.

A la Dra. Ma. Teresa González Garza por sus consejos y por su amistad.

A la comisión de tesis que esta integrada por Dr.Salvador Saíd Fernández, Dra. Ma. Teresa González Garza y B., Dra. Herminia G. Rodríguez Martínez, Dr. Mario Morales Vallarta, Dr. Mohammed Badii por sus acertadas recomendaciones en la elaboración del proyecto de investigación y en la revisión del manuscrito.

A mis amigos y compañeros Delia, Lorena, Norma y Antonio Narro porque supieron apoyarme cuando más lo necesite.

A la M.C. Pilar Carranza Rosales por su ayuda y experiencia en la parte experimental del presente trabajo.

A la Q.F.B. Carolina Trujillo por su valiosa trabajo de laboratorio.

Al Dr. Antonio Luna y el Sr. Francisco Treviño por su amable disposición para la elaboración del trabajo de fotografía.

Al M.V.Z. Gerardo Lozano por su ayuda en el manejo de animales de experimentación y su agradable compañía.

A la Sra. Ma. del Refugio Mendoza por todas las facilidades otorgadas en la recuperación de referencias bibliográficas y por su amistad.

A la Elva I, María de los Angeles Rojas, Martha y Alma Delia por su ayuda desinteresada.

Al Dr. Diego González Ramírez por su gran apoyo en mi superación.

M.C. Isaias Balderas por sus enseñanzas en Biología Molecular.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgo para la realización de mis estudios.

A todos mis compañeros, familiares, amigos y aquellas personas que de una forma u otra colaboraron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis amores:

Mi esposo Leonel y mi hijo Leonel Abraham quienes con su amor y paciencia han contribuido enormemente en la realización de este trabajo.

**A la memoria de mi Padre Ramón Sampayo Lozano
quien fue el mejor ejemplo de
Amor, Honestidad y Trabajo.**

**A mi madre María Luisa Reyes de Sampayo.
Por su gran apoyo y por ser quien soy.**

A mis hermanos

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CMR	Células de miocardiocitos de rata
CPIB	Acido para-cloro fenoxiisobutírico (Acido clofbrico)
FAD	Derivados de los ácidos fibricos
Fig.	Figura
g	Gramos
h	Horas
kDa	Kilodaltones
l	Litro
M	Molaridad
Min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Bromurode 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
N	Normalidad
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PMS	Metosulfato de Fenazina
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSB	Solución salina balanceada de Hanks
TA	Temperatura ambiente
TBS	Amortiguador tris salino
TEMED	N-N-N'- tetrametil etilen diamina
Tris	Tris-hidroximetil-amino metano
TTBS	Amortiguador tris salino-tween
%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µM	Micromolar
V	Voltios
1X	Representa su concentración respecto a la solución de trabajo.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
<i>Las dislipidemias y su tratamiento</i>	1
<i>Mecanismo de acción</i>	6
<i>Estructura química del clofibrato y del ácido clofíbrico</i>	6
<i>Antecedentes directos</i>	7
<i>Importancia de la vimentina y desmina en el citoesqueleto</i>	10
<i>Cultivos celulares</i>	15
IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD.....	16
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	17
GENERAL Y ESPECIFICOS.....	17
MATERIALES	
1. EQUIPO.....	18
2. MATERIAL BIOLÓGICO	19
3. ORIGEN DE LOS REACTIVOS.....	19
METODOS.....	20
<i>Lavado de material</i>	20
<i>Esterilización</i>	20
<i>Composición y preparación de las soluciones</i>	20
<i>Acido clorhídrico 0.04 M en isopropanol (Isopropanol ácido)</i>	20
<i>Almacenamiento del medio de cultivo CMRL 1066.</i>	20
<i>Amortiguador de pH isotónico de tris Salino TD (1X)</i>	21
<i>Amortiguador de pH (Buffer F)</i>	21
<i>Colágeno solución</i>	21
<i>Electroinmunotransferencia (soluciones)</i>	22

<i>Amortiguador de transferencia</i>	22
<i>Solución bloqueadora</i>	22
<i>TBS (Amortiguador Tris Salino)</i>	22
<i>TTBS (Amortiguador Tris -Salino-Tween)</i>	22
<i>Anticuerpo primario</i>	22
<i>Anticuerpo secundario</i>	22
<i>Estándar de Seroalbúmina Bovina de 1 mg/ml</i>	22
<i>Solución de NaCl 40 mM</i>	22
<i>Geles de poliacrilamida (soluciones)</i>	22
<i>Geles de poliacrilamida 8 % y 10 %</i>	23
<i>Mezcla de antibióticos 100 X (Penicilina 200,000 UI : Estreptomina 0.5 g)</i>	23
<i>MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) [2 mg/ml]</i> ...	24
<i>Preparación del medio de cultivo CMRL</i>	24
<i>Preparación de las drogas</i>	24
<i>PMS (Metasulfato de Fenazina) [3.5 mg/ml]</i>	24
<i>Rojo de fenol (solución al 1 %)</i>	25
<i>Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)</i>	25
<i>Solución Salina Balanceada de Hanks SSB (1X)</i>	25
<i>Suero fetal bovino y de caballo. Descomplementación y almacenamiento</i>	25
<i>Tripsina al 1.0% (concentrado)</i>	26
<i>Tripsina-TD 0.1% (1X)</i>	26
<i>Soluciones para marcaje de células con anticuerpos inmunofluorescentes.</i>	
<i>Amortiguador PBS salino</i>	26
<i>Amortiguador de PBS con MnCl₂ 2 mM</i>	26
<i>PBS salino con MnCl₂ 2 mM, EDTA 10 mM</i>	26
<i>Solución de formaldehído 4.0%, con Tritón X-100 0.05%</i>	26
<i>Solución fijadora con Metanol:cloroformo</i>	26
<i>Preparación del primer anticuerpo anti-desmina y anti-vimentina</i>	26
<i>Solución de PBS MnCl₂ 2 mM con Tween 20 al 0.1%</i>	26
<i>Preparación del segundo anticuerpo anti-ratón-flouresceína</i> ...	27
<i>Ioduro de propidio (1µg/ml)</i>	27

EXPERIMENTACION: <i>in vivo</i>	27
<i>Tratamiento de los animales con clofibrato y ácido clofíbrico</i>	27
<i>Obtención de las muestras a partir de corazón para realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	28
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	28
<i>Preparación y corrimiento del gel</i>	28
<i>Electrotransferencia y detección de vimentina o desmina</i>	29
<i>Análisis densitométrico</i>	30
EXPERIMENTACIÓN :<i>in vitro</i>	
<i>Obtención del cultivo de células. Monocapa</i>	31
<i>Verificación de la viabilidad celular</i>	31
<i>Tratamiento de células con ácido clofíbrico.</i>	32
<i>Determinación del porciento de citolisis inducida por el ácido clofíbrico mediante la técnica de MTT</i>	32
<i>Determinación de proteínas totales (Bradford M., 1976)</i>	33
<i>Preparación de las muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida a partir de cultivos primarios de células de miocardiocitos <i>In vitro</i>.</i>	33
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	34
<i>Electrotransferencia y detección del anticuerpo</i>	34
<i>Análisis densitométrico de desmina y vimentina</i>	34
<i>Inmunofluorescencia. Marcaje con anticuerpos de las células de miocardiocitos</i>	34

RESULTADOS

I. EFECTOS DEL CLOFIBRATO Y ÁCIDO CLOFÍBRICO SOBRE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO DE CORAZÓN INSOLUBLES EN TRITÓN- X-100.

Modificación de los patrones electroforéticos de proteínas totales citoesqueleto. ..36	
<i>Análisis densitométrico de los patrones electroforéticos de proteínas totales.....</i>	<i>37</i>
<i>Disminución de la densidad de vimentina de miocardiocitos de ratas tratadas con ácido clofíbrico y clofibrato.....</i>	<i>38</i>
<i>Análisis densitométrico de vimentina en corazón de ratas tratadas con clofibrato y ácido clofíbrico.....</i>	<i>40</i>
<i>Disminución de la densidad de la banda de desmina de miocardiocitos de ratas tratadas con ácido clofíbrico y clofibrato.....</i>	<i>41</i>
<i>Análisis densitométrico de desmina en corazón de ratas tratadas con clofibrato y ácido clofíbrico.....</i>	<i>42</i>

EXPERIMENTOS *in vitro*

II. CULTIVOS PRIMARIOS DE MIOCARDIOCITOS DE RATA.....	44
<i>Viabilidad celular.....</i>	<i>45</i>

EFECTO DEL ÁCIDO CLOFÍBRICO SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE MIOCARDIOCITOS

<i>Efecto letal del ácido clofíbrico sobre la viabilidad de cultivos primarios de miocardiocitos.....</i>	<i>46</i>
<i>Análisis de proteínas insolubles con Tritón X-100 del citoesqueleto de los miocardiocitos sin tratamiento o tratados con ácido clofíbrico.....</i>	<i>47</i>
<i>Disminución de la densidad de las bandas de vimentina por efecto del ácido clofíbrico en cultivos de miocardiocitos de rata.....</i>	<i>48</i>

<i>Disminución de la densidad de las bandas de desmina por efecto del ácido clofibrico en cultivos de miocardiocitos de rata</i>	49
<i>Análisis densitométrico</i>	50
<i>Cambios en la distribución de vimentina en el citoesqueleto de miocardiocitos tratados con ácido clofibrico 0.1 mM</i>	52
<i>Cambios en la distribución de desmina en el citoesqueleto de miocardiocitos tratados con ácido clofibrico 0.1 mM</i>	53
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Cambios en los patrones electroforéticos de proteínas totales insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de miocardiocitos de ratas (CMR) tratadas con clofibrato o ácido clofibrico.....36**
- Figura 2. Densitometría de los patrones electroforéticos de proteínas totales insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de miocardiocitos de ratas a diferentes tratamientos.37**
- Figura 3. Disminución de la densidad de la banda de vimentina en patrones electroforéticos de proteínas del citoesqueleto en animales tratados con clofibrato y ácido clofibrico.39**
- Figura 4. Perfil densitométrico de la vimentina.....40**
- Figura 5. Disminución de la densidad de la banda de desmina en patrones electroforéticos de proteínas del citoesqueleto en animales tratados con clofibrato y ácido clofibrico.41**
- Figura 6. Perfil densitométrico de la desmina.42**
- Figura 7. Aspecto del cultivo primario de miocardiocitos normales de rata.44**
- Figura 8. Cultivo primario de miocardiocitos de rata tratado con ácido clofibrico 0.1 mM.45**
- Figura 9. Análisis electroforético de las proteínas de cultivos primarios de miocardiocitos de rata sin tratamiento y tratados con ácido clofibrico 0.1mM.... 47**
- Figura 10. Inmunolocalización de vimentina en cultivos de CMR sin tratamiento y tratadas con ácido clofibrico.48**

Figura 11. Inmunolocalización de desmina en cultivos de miocardiocitos sin tratamiento y tratados con ácido clofibrico.	49
Figura 12. Densitograma correspondiente a la electroinmunotransferencia de vimentina.	50
Figura 13. Densitograma correspondiente a la electroinmunotransferencia de desmina.....	51
Figura 14. Modificación de la organización de la vimentina en el citoesqueleto de células tratadas con 0.1 mM de ácido clofibrico.	52
Figura 15. Modificación de la organización de la desmina en el citoesqueleto de células tratadas con 0.1 mM de ácido clofibrico.	53
Tabla 1. Disminución del área bajo la curva de los densitogramas de las proteínas del citoesqueleto vimentina y desmina.	38
Tabla 2. Disminución de las bandas de vimentina y desmina por efecto del ácido clofibrico y clofibrato.	43
Tabla 3. Efecto del ácido clofibrico sobre la viabilidad de cultivos primarios de miocardiocitos de rata.	46
Tabla 4. Disminución del contenido de vimentina y desmina en los cultivos de miocardiocitos tratados con ácido clofibrico a dosis de 0.1 mM.	51

RESUMEN.

Clofibrato, fenofibrato y gemfibrozil, son drogas que principalmente se utilizan en casos de hiperlipidemia. El empleo de estos medicamentos se ha asociado con muertes por accidentes vasculares en el miocardio, diferentes al infarto; además, pueden inducir arritmias, mialgia y miolisis. El metabolito activo del clofibrato es el ácido clofibrico. Los efectos de los ácidos fibricos a nivel celular no están bien caracterizados. Algunos autores han estudiado cultivos primarios de miocardiocitos de pollo, tratados con fenofibrato, encontrando concentraciones menores de desmina y vimentina, las cuales son proteínas asociadas con el citoesqueleto de células cardíacas. Es importante analizar los efectos tóxicos del ácido clofibrico *in vivo* e *in vitro* sobre el citoesqueleto de miocardiocitos de mamífero, porque los daños en el citoesqueleto podrían ser una causa de cardiopatías en individuos bajo tratamiento con ácidos fibricos. En forma análoga a lo que sucede con miocardiocitos de pollo, el ácido clofibrico podría inducir modificaciones en la proporción de vimentina y desmina en miocardiocitos de mamífero originando alteraciones en citoesqueleto de estas células. Nuestro objetivo fue analizar el efecto del clofibrato y del ácido clofibrico sobre el contenido de desmina y vimentina en miocardiocitos de rata tanto *in vivo* como *in vitro*.

Pruebas *in vivo*. Se obtuvieron células de miocardiocito de animales tratados con clofibrato o ácido clofibrico, se procesaron los extractos de células para llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida y electroinmunotransferencia para la detección de vimentina y desmina. Posteriormente se valoraron cada una de las bandas mediante densitometría, encontrando una disminución en la densidad de las bandas correspondientes a la vimentina y a la desmina.

Para las pruebas *in vitro* se obtuvieron miocardiocitos de ratas recién nacidas para establecer cultivos primarios, los cuales se trataron con ácido clofibrico y se determinó el porcentaje de citolisis. De igual forma que en los experimentos *in vivo* se procesaron los extractos de células y se realizó la electroforesis en geles de

poliacrilamida y electroinmunotransferencia para la detección de vimentina y desmina. Los cambios se valoraron mediante densitometría y se observó una disminución significativa en la densidad de las bandas de vimentina y desmina.

Las células de miocardiocitos de rata recién nacida, se marcaron con anticuerpos específicos fluorescentes para visualizar los filamentos de vimentina y desmina y se mostró que las células tratadas con ácido clofibrico sufren alteraciones aparentes en la malla de esos filamentos.

Considerando el papel que juegan los filamentos intermediarios como puntos de anclaje y que cualquier alteración en estas proteínas pudieran alterar la organización celular de los miocardiocitos, es posible que la disminución observada de estas proteínas durante la administración de estos fármacos sea en parte responsable de los efectos secundarios observados en pacientes.

INTRODUCCION

Las dislipidemias y su tratamiento.

Existen seis clases de lipoproteínas que difieren entre sí en cuanto a su densidad, composición de lípidos y contenido de apolipoproteínas. Las lipoproteínas se conocen como: Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL), de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), quilomicrones y remanentes de quilomicrones. Esta clasificación se basa en la densidad de lipoproteínas en la ultracentrifugación. La siguiente tabla muestra las características de las lipoproteínas.

Clase de Lipoproteína	Densidad	Clases de lípidos	Principales apolipoproteínas
Quilomicrones Y remanentes	1.006	Triglicérido	apoB48, apoA-1, apoA-II, apoA-IV, apoC-II/C-III, apo-E.
VLDL	1.006	T. endógenos	ApoB-100, apo-E, apoCII/C-III
IDL	1.006 a 1.019	Colesterol ésteres Triglicérido	ApoB-100, apo-E, apoCII/C-III
LDL	1.019 a 1.063	Colesterol ésteres	ApoB-100
HDL	1.063 a 1.210	Colesterol ésteres Fosfolípidos	apoA-1, apoA-II, apoC-II/C-III

Las lipoproteínas que contienen ApoB-100 (VLDL, IDL, LDL) transportan lípidos endógenos desde el hígado hacia tejidos no hepático, los quilomicrones transportan lípidos de la dieta desde el intestino hacia tejidos periféricos y hepáticos, las que contienen apoA-1 (de alta densidad) ayudan en la transferencia de lípidos entre lipoproteínas y a transportar colesterol de regreso al hígado desde tejidos periféricos (Witzum J.L., 1997).

La homeostasis del colesterol y triglicéridos se mantiene en el organismo gracias a un mecanismo complejo en el que intervienen numerosos factores. Entre ellos, la regulación del metabolismo de los lípidos, la síntesis de lipoproteínas específicas,

receptores celulares de lipoproteínas, enzimas lipolíticas y enzimas transportadoras. La alteración de los valores normales de la concentración sanguínea de alguno de estos elementos se conoce como dislipidemia (Goldstein y cols., 1983).

El metabolismo de los lípidos consiste en varias fases. El colesterol procede de la dieta diaria (vía exógena) o es sintetizado por el organismo (vía endógena).

Vía endógena: En los hepatocitos las Apo-B100 se combinan con triglicéridos y colesterol y fosfolípidos y se secretan como una lipoproteína de muy baja densidad. Una vez que las partículas de lipoproteína de muy baja densidad circulan, su contenido de triglicérido se hidroliza mediante una lipoproteinlipasa que está unido al endotelio de capilares en tejido adiposo y muscular. La lipoproteinlipasa se activa mediante apoC-II unida a la superficie de lipoproteínas de muy baja densidad, y los ácidos grasos liberados pueden entrar a los adipocitos, donde se reestirifican y se almacenan como triglicéridos, o al músculo donde se oxidan para obtener energía.

La partícula de lipoproteína de muy baja densidad residual es llamada remanentes de VLDL o lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Estas partículas son removidas directamente de la circulación por los receptores LDL en el hígado o permanecen en el plasma para ser convertidos a lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Cuando el hígado o los tejidos extrahépatos requieren más colesterol aumenta el número de receptores de lipoproteínas de baja densidad sobre la superficie celular y se extrae del plasma más lipoproteínas de este tipo por medio de la vía del receptor de las mismas. Por el contrario cuando disminuye la necesidad de colesterol, se aminora la síntesis del receptor de lipoproteínas de baja densidad. La regulación de la vía del receptor de lipoproteínas de baja densidad hepática es el mecanismo dominante para controlar las concentraciones de dichas lipoproteínas en seres humanos (Witzum J.L., 1997).

Vía exógena: Después de la ingestión de grasa en la dieta, los triglicéridos y el colesterol se absorben hacia las células intestinales como ácidos grasos y colesterol libre. Dentro de las células de la mucosa del intestino, los ácidos grasos se reesterifican y junto con el colesterol, se incorporan en el centro de unas partículas llamadas quilomicrones. La cubierta de la superficie de la partícula está compuesta de fosfolípidos y apolipoproteínas A-I, A-II, y A-IV y Apo-48. La Apo-48 es el producto del mismo gen que codifica para la ApoB-100 en el hígado, la Apo-48 se transcribe, pero el mRNA se edita mediante un cambio de citosina por uracilo que produce un codón de paro prematuro que solo el 48% de la región del codón del gen se traduce. Los quilomicrones entran en plasma por medio del conducto torácico, donde adquieren apoC-II/C-III y Apo-E mediante transferencia y después interactúan con la lipoproteinlipasa de una manera análoga a la descrita en la vía endógena. En donde se hidrolizan los enlaces éster y reduce los triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol. Los quilomicrones sin triglicéridos son llamados remanentes de quilomicrones. Se eliminan con rapidez por el hígado por un proceso mediado por receptores en el hígado.

Los receptores de quilomicrones remanentes y los receptores LDL son los responsables de proveer colesterol a las células, se cree que otros receptores para las lipoproteínas de alta densidad (HDL) promueven la interacción de partículas HDL con la superficie celular para facilitar la incorporación de colesterol intracelular por un transporte eventual al hígado donde es excretado y/o convertido en ácidos biliares (Witzum J.L., 1997).

Las dislipidemias han clasificado tal como se resume en la siguiente tabla:

Trastorno	Anormalidad de lipoproteinemia	Defecto bioquímico
Hipercolesterolemia familiar	LDL (aumenta)	Deficiencia en los receptores LDL
Defecto de Apolipoproteína B	LDL (aumenta)	Mutante ApoB
Hipercolesterolemia Poligénica	LDL (aumenta)	Desconocido
Deficiencia de la lipoproteinlipasa	Quilomicrones (aumenta)	Deficiencia de la lipoproteinlipasa
Hipertrigliceridemia familiar	VLDL (aumenta)	Desconocido
Hipertipemia familiar combinada	VLDL, LDL (aumenta) HDL (disminuye)	Desconocido

Todos estos trastornos del metabolismo son los responsables de un proceso vascular degenerativo conocido como aterosclerosis (Kannel y cols., 1979, Díaz-Barreiro y cols.,1990). La aterosclerosis, a su vez, es la causa directa de diversos problemas de salud, como la angina de pecho, trombosis e infartos. Los infartos de consecuencias más graves son los que afectan a órganos vitales como el cerebro o el corazón (Díaz-Barreiro y cols., 1990).

En México las enfermedades cardiovasculares han ocupado uno de los primeros lugares como causa de muerte desde 1978 (Díaz-Barreiro y cols.,1990). En cambio, en otros países, como Estados Unidos la mortalidad de origen cardiovascular muestra una tendencia a disminuir (Díaz-Barreiro y cols.,1990).

La forma más adecuada para controlar las dislipidemias consiste en modificar los hábitos alimentarios de la población, disminuyendo la ingesta diaria de huevos, carnes rojas, vísceras y grasa de origen animal y sustituyendo esta fuente de energía por

carbohidratos simples y complejos de origen vegetal (Martin D.W. y cols.,1982). Además de una ingesta excesiva de lípidos de origen animal (En México, por ejemplo, el consumo diario por persona es entre 400 y 500 mg de colesterol) (Díaz-Barreiro y cols.,1990), existen dislipidemias que se desarrollan como consecuencia de trastornos metabólicos que impiden al organismo el manejo adecuado de colesterol y de ácidos grasos insaturados (Olson y cols., 1988).

En algunos de estos casos no es suficiente una dieta pobre en colesterol y ácidos grasos insaturados para controlar la dislipidemia. Entonces se recurre al uso de medicamentos hipolipemiantes e hipocolesterolemiantes. Estos medicamentos permiten prevenir la formación de placas ateromatosas o detener su crecimiento (Olson y cols., 1988).

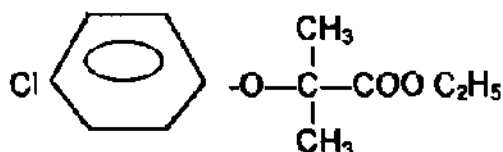
Los compuestos hipocolesterolemiantes de uso más frecuente son el ácido nicotínico a dosis de 3-6 g/día, usados en pacientes con hipercolesterolemia reduce las concentraciones de LDL hasta en un 20 a 33%, aumenta los niveles de HDL hasta en un 10 a 20 % y reduce los triglicéridos en plasma en un 20 a 40%. El hexa hidro naftalen metil butirato ester hidroxí ácido (lovastatin) es un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil glutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA-reductasa), por lo que se impide la conversión de ácido 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA a mevalonato y éste a su vez participa en la síntesis de colesterol, el resultado final es la disminución de los niveles de colesterol en sangre, dejando un incremento compensatorio en el número de receptores de LDL sobre la membrana celular y una estimulación del catabolismo de la LDL. El lovastatin actúa primeramente en el hígado, se cree que la capacidad de esta droga para disminuir las concentraciones de LDL resulta de un incremento en el catabolismo de las LDL y una reducción en la producción de VLDL. (Bilheimer y cols. 1983; Grundy y Vega, 1985). Algunos derivados de ácidos fibricos tales como gemfibrozil, se utilizan en pacientes con hipertrigliceridemia familiar ya que reducen las concentraciones de triglicéridos de un 75-90% (Quilomicrones y VLDL). El bezafibrato, fenofibrato y cipofibrato son más efectivos en el tratamiento de la hipercolesterolemia que el clofibrato y el gemfibrozil.

Se ha propuesto que el mecanismo de acción del clofibrato consiste en inhibir la enzima hepática alfa-glicerofosfatodeshidrogenasa, que participa indirectamente en la síntesis de triglicéridos, inhibiendo la liberación hepática de VLDL. Por otro lado se cree que la reducción de los lípidos por medio de los fibratos resulta de un incremento en la actividad de la lipoproteinlipasa, aumentando el catabolismo de la LDL y reduciendo la síntesis de VLDL (M. Chevais, 1980). Sin embargo el mecanismo por el cual disminuyen los niveles de lípidos y aumentan la HDL (lipoproteínas de alta densidad) no está muy claro (Illingworth, 1991).

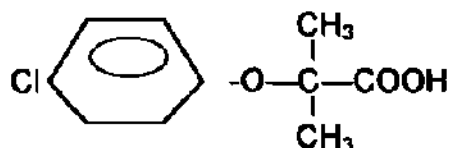
Dentro de los principales efectos secundarios no deseados de estos medicamentos se encuentran la miolisis, miotonía, arritmia ventricular, arritmia arterial, dolor muscular generalizado y problemas gastrointestinales.

Estructura química de las drogas.

CLOFIBRATO



AC. CLOFÍBRICO (metabolito activo)



Formula estructural del clofibrato y el ácido clofibrico.

Antecedentes directos.

El clofibrato ha sido utilizado desde 1962 por Thorp y Waring quienes observaron una disminución de lípidos séricos en ratas. En 1967 este medicamento fue aprobado en Estados Unidos para uso en humanos. Su metabolito activo es el ácido clofibrico, conocido también con el nombre de ácido 2-(p-clorofenoxyisobutirico, CPIB) (Bettoni G., y cols., 1987).

En años recientes se han visto incrementadas más de diez veces las prescripciones para los medicamentos que disminuyen la concentración de lípidos séricos en sangre, con más de 26 millones en 1992 solo en Estados Unidos (T.B. Newman, 1996). El resultado de la información recabada por estos autores indicó que todos los derivados de ácidos fibrícos causaron cáncer en roedores y enfatizan que deben ser considerados como cancerígenos potenciales y que sugieren que la utilización de estas drogas debe examinarse enérgicamente sobre el punto de riesgo-beneficio. Aunque es incierta la extrapolación de carcinogénesis en humanos debería considerarse en un momento dado la utilización de estos medicamentos.

En 1978 un grupo de investigadores cuyo principal objetivo era la prevención de enfermedades cardíacas, llevó a cabo un seguimiento de pacientes a los cuales se les administró clofibrato durante 4 años. Observaron un incremento significativo de un 11% en la mortalidad por causas diferentes al infarto comparado con el control. Dentro de las principales causas de muerte observaron problemas de neoplasias malignas y alteraciones respiratorias, entre otras (Report of the Committee of Principal Investigators, 1984). A partir de estos resultados, la utilización del clofibrato ha disminuido paulatinamente hasta la fecha, sin embargo la utilización en general de los ácidos fibrícos continua siendo necesaria.

A.L.,Gould , y cols., en 1995 llevaron a cabo un experimento durante dos años en humanos, en esta investigación, los pacientes se dividieron en grupos a los cuales se les administró gemfibrozil, clofibrato u hormonas, observando que con los fibratos

se incrementó la mortalidad un 30 % por causas no cardíacas y disminuyó un 13 % la mortalidad por problemas cardíacos. Y con hormonas incrementó la mortalidad 27 % por problemas cardíacos y la mortalidad total aumentó un 33 % por causas diferentes. Con estos datos concluyeron que la disminución de colesterol fué benéfica, pero los efectos adversos de los derivados de ácidos fibricos y hormonas incrementan el riesgo de mortalidad por causas no cardíacas.

En un estudio clínico se encontró que 10 pacientes con dislipidemia tratados diariamente con 800 mg de gemfibrozil, por 4 semanas tuvieron una reducción significativa en la retención de plaquetas sobre columnas de vidrio y hubo una tendencia hacia una disminución en la coagulación inducida por ADP, adrenalina o colágeno. Este trabajo sugirió que el gemfibrozil no sólo corrige la dislipidemia sino que también puede contrarrestar la coagulación acelerada que suele observarse en algunos tipos de dislipidemias. Una situación similar parece ocurrir con el clofibrato (Todd P.A. y cols., 1988).

Por otro lado, en ratas tratadas durante dos semanas con clofibrato, bezafibrato y ciprofibrato a dosis de 0.3%, 0.1% y 0.016% respectivamente suplementada en el alimento, se observó que el ester de colesteril en los microsomas disminuyó un 60 % en los animales tratados con bezafibrato y ciprofibrato comparado con los testigos no tratados; no se encontraron diferencias para los animales tratados con clofibrato (Stahlberg, D. y cols., 1989).

Se ha observado que en ratas tratadas con una sola dosis de clofibrato de 400 mg /kg aumenta la masa del hígado y la activación en la síntesis de DNA (J. Seifert y cols., 1987). El aumento en el peso del hígado por efecto del clofibrato también se ha observado en perros, monos y humanos y se ha propuesto que el responsable de este efecto no es el clofibrato, sino su principal metabolito, el ácido clofibrico (Platt D.S. y cols., 1966). Este aumento en el peso del hígado (con una proliferación de la actividad de enzimas peroxisomales como catalasa, glicerofosfato aciltransferasa, carnitina acetiltransferasa, enoil coenzima A hidratasa) y la hepatomegalia, la cual está relacionada con la inducción del neoplasias hepáticas en animales, también se

observó en roedores, principalmente ratas, a las que se les administraron gemfibrozil o clofibrato (Todd P.A., 1988, Platt D.S. y cols., 1966. Yi-Han Chang , y cols., 1967).

La importancia de peroxisomas es evidente por el hecho de que su ausencia o la disfuncionalidad de una o más enzimas peroxisomales es invariablemente fatal. Los peroxisomas son organelos citoplasmáticos de membrana simple presentes en la mayoría de las células animales y plantas. Aunque existen en varios tejidos son más abundantes en el hígado y riñón. Están involucrados en un número de funciones esenciales celulares como la respiración celular, gluconeogenesis, metabolismo de lípidos.

Se ha establecido que el ácido clofibrato se une en un sitio específico de la albúmina, este sitio es el mismo que es ocupado por factores endógenos tales como la androsterona, la L-tiroxina, el fosfato de piridoxal, ácidos grasos no esterificados y el L-triptofano. También se ha demostrado que la tiroxina es desplazada por el ácido clofibrato en el hígado y así potencia los efectos hepáticos de hormonas endógenas principalmente los esteroides. Además, se observó que la tiroidectomía en ratas se evitó el efecto del ácido clofibrato, se postula entonces que la hipertrofia del hígado en ratas es debido a una respuesta no específica a los compuestos lipido-solubles en general (Platt D.S. y cols., 1966).

También ha sido investigada la influencia del clofibrato sobre el metabolismo de glucosa y ATP en músculo cardíaco y esquelético de ratas encontrando que después de tres semanas de exposición, el glucógeno disminuye al igual que los niveles de ATP (Wilkening, J., y cols., 1978). Además, el clofibrato es capaz de disminuir la conductancia al ión cloro tanto de membranas de músculo, cardíacas, así como de otro tipo de membranas, se cree que la droga se une a sitios específicos o receptores que pueden regular el flujo del ión cloro, de esta manera puede desencadenar un incremento en la excitabilidad de la membrana llevándolo al estado miotónico, lo cual se manifiesta por una contracción muscular lo que provoca dolor muscular y

debilidad (Bettoni G. et al 1987). Este compuesto además produce miopatía en ratas y en el hombre (1977, Kwiecinski H., 1988, Afifi A.K. y cols., 1984).

El clofibrato administrado a ratas macho Sprague Dawley a dosis de 300 mg/kg de peso, diariamente por 40 días, produce algunos cambios sobre el perfil protéico de membrana de eritrocitos (un incremento en la β -espectrina, una disminución en las ankirinas, proteína 4.1 y proteína 6), (Morales-Aguilera y Sampayo-Reyes, 1993) así como también (equinocitos) alteraciones en la forma y menor resistencia osmótica, por lo que estas proteínas podrían tener una expresión sobre las propiedades funcionales (Sampayo-Reyes y Morales-Aguilera, 1994). Debido a estos cambios, se piensa que estas drogas pudieran estar alterando también las proteínas del citoesqueleto de otro tipo de células, principalmente en el corazón.

Importancia de la vimentina y desmina con el citoesqueleto.

La habilidad de células eucariotas para adoptar una gran variedad de formas y llevar a cabo movimientos coordinados depende de una malla compleja de filamentos de proteínas que se extienden en todo el citoplasma. Esta malla es llamada citoesqueleto, tiene una estructura dinámica responsable de los movimientos y forma celular, también en la división celular y algunas respuestas al medio ambiente. Las actividades diversas del citoesqueleto dependen básicamente de tres tipos de estructuras filamentosas: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermediarios (FI). Cada tipo de filamento está formado de subunidades de proteínas diferentes. Por ejemplo, actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos y la familia de proteínas fibrosas relacionadas con la vimentina o lamina y desmina (Gerald Karp, 1987, Bruce Alberts, 1994).

El citoesqueleto de las células animales está parcialmente compuesto de una malla de filamentos intermediarios (FI) de proteína, los cuales mantienen la estructura celular. Los filamentos son polímeros de polipéptidos fibrosos. Una gran variedad de formas de tejidos específicos difieren en el tipo de polipéptidos: polipéptidos de queratina para células epiteliales, neurofilamentos para células nerviosas, filamentos

gliales para astrocitos y células de Schwann, filamentos de desmina para células musculares y filamentos de vimentina para fibroblastos y de otros tipos de células. Las láminas nucleares, las cuales forman láminas fibrosas en la envoltura nuclear, son una familia separada de filamentos de proteína intermediarios que están presentes en todas las células eucarióticas. Estos filamentos también predominan en las zonas tales como las bandas Z del citoplasma de los sarcómeros, los cuales están sujetos a tensión mecánica y son los componentes más estables del citoesqueleto y al mismo tiempo los menos solubles de todas las estructuras celulares (Gerald Karp, 1987).

Los polipéptidos de los diferentes tipos de filamentos difieren en la secuencia de aminoácidos y tienen pesos moleculares muy diferentes, pero contienen un dominio central que forma una estructura rígida cuando forman dímeros. Las subunidades de dímeros se asocian unas con otras para formar los filamentos intermediarios. La variación de estos polipéptidos y su asociación con otros componentes celulares permite explicar las propiedades mecánicas de los filamentos requeridos de un tipo particular de células (Gerald Karp, 1987, Bruce Alberts, 1994).

Los filamentos que contienen desmina, una proteína de 53 kDa, se encuentran en células musculares de tipo esquelético cardíaco y liso. La función de las células musculares depende de un ensamblado sumamente organizado de filamentos contráctiles y se ha sugerido que la desmina sirve como un integrador espacial de los diferentes componentes de la célula muscular en una unidad funcional capaz de acortarse (Gerald Karp, 1987, Bruce Alberts, 1994).

Los filamentos que contienen vimentina son los más difundidos, esta proteína de 57 kDa se encuentra en la mayor parte del cuerpo, a menudo estas proteínas interconectan la envoltura nuclear y la membrana plasmática. Esto ha dado lugar a la sugerencia de que estos filamentos pueden participar en el soporte del núcleo y en el mantenimiento de su posición dentro de la célula. Cabe además mencionar que los filamentos de desmina y vimentina pueden copolimerizar a fin de formar los filamentos intermediarios (FI) que contienen ambos tipos de subunidades (Gerald Karp, 1987).

Los dímeros de desmina y vimentina se asocian en forma paralela. Las subunidades proteicas de estos filamentos son alfa hélices organizadas como tetrámeros, uniéndose de dos en dos, cola con cola (Quinlan-R.A., y cols., 1986).

En cultivos de embrión de pollo *in vitro* tratados con ácidos fibrícos como el gemfibrozil, el fenofibrato y el bezafibrato a una concentración de 0.1% W/V, se ha observado que producen cambios en la concentración de vimentina y desmina. El gemfibrozil incrementa en 26% y 10% el contenido en el citoesqueleto de vimentina y desmina respectivamente. En cambio cuando las células se tratan con fenofibrato el contenido de vimentina y la desmina disminuye en un 13% y 4% respectivamente, en cultivos tratados con bezafibrato la desmina se aumenta un 17%, mientras que la vimentina no muestra cambios significativos con respecto al control (González F.J. y cols., 1991).

En otro trabajo las células de miocardiocitos de pollo cultivadas, tratados 6 y 24 h con derivados de ácido fibrícos como el bezafibrato (10 µg/ml), gemfibrozil (23 µg/ml) o fenofibrato (30 µg/ml) se pudo observar que se alteran las proteínas celulares y subcelulares. El bezafibrato y fenofibrato produjeron un incremento en la concentración de alpha-actinina, troponina T y tropomiosina, en ambas fracciones, mientras que el gemfibrozil no alteró estas proteínas. Dado el importante papel de estas proteínas sobre la contracción del músculo cardíaco y los cambios inducidos por derivados de ácidos fibrícos, se piensa que las alteraciones de algunas de estas proteínas pueden estar relacionados con los efectos secundarios de estas drogas sobre el corazón (Velez-C. y cols., 1993).

El citoesqueleto de las células musculares, incluyendo a las cardíacas contienen actina, vimentina, desmina y tropomiosina (Kocher-O, y cols., 1985). Estas proteínas se han estudiado con detalle en ratas, durante su desarrollo embrionario; a los 18-20 días de gestación, y después del nacimiento, a los 5 y 14 días de edad o a las 5 a 12 semanas de edad. Se ha observado que las células cardíacas de animales recién

nacidos se replican activamente, mientras que en el adulto la replicación es mínima. Se sabe que el contenido de actina, vimentina, desmina y tropomiosina incrementa gradualmente desde que un animal está en gestación hasta que es adulto, en sus células cardíacas. Por otro lado, el número de células que contienen desmina se incrementa de 13% en ratas fetales a 51% en ratas adultas (Kocher-O, y cols., 1985).

En otros experimentos realizados por Nikkari, y cols., 1990 también se han demostrado cambios en la composición de proteínas del citoesqueleto y proteínas contractiles de células de músculo de rata de aorta durante la edad a 4, 12, 30 y 36 meses y se observó que la cantidad de miosina y desmina disminuyeron con la edad, mientras que la actina y vimentina permanecieron sin cambios.

En cultivos primarios de células de músculo liso aisladas de miometrio de rata adulta, se han observado algunas alteraciones en la estructura y organización del citoesqueleto asociándose al crecimiento. Mediante tinciones específicas para vimentina y desmina se encontró que los cultivos reaccionan a los filamentos de desmina solamente dentro de los primeros días y más tarde en los siguientes días los cultivos expresan la vimentina; cinco días más tarde son positivos a ambas proteínas, posteriormente la tinción para la desmina disminuye, mientras que para la vimentina aumenta. Todos estos cambios sugieren que dependiendo del tiempo de desarrollo de las células, éstas contienen proporciones diferentes de esas proteínas (Palmberg L. y cols., 1986).

Usando anticuerpos contra vimentina o desmina acoplados a marcadores fluorescentes se ha observado en células cardíacas que la vimentina y la desmina son organizadas como estructuras filamentosas orientadas longitudinalmente. Estas proteínas probablemente proveen una malla que facilita el ensamble de miofibrillas, involucrados en la organización de organelos citoplásmicos celulares manteniendo la posición del núcleo en el citoplasma de la célula (Nag AC, y cols., 1986).

Los filamentos de desmina son considerados como marcadores de la diferenciación celular; algunos autores han usado anticuerpos monoclonales específicos para caracterizar la expresión de desmina durante las fases de maduración del corazón y han demostrado que existe una relación directa entre la expresión de esta proteína y el desarrollo de miocardiocitos. Observando que en miocardiocitos auriculares la desmina está presente en los estados de desarrollo tardíos (Muros Ma. y cols., 1990).

Se han llevado a cabo también una serie de experimentos en donde se determinaron la cantidad y distribución de la troponina de cultivos de miocardiocitos de embrión de pollo, encontrando que en el estado embrionario la acumulación de la troponina T se incrementa significativamente después de 8 días de cultivo (Velez C. y cols., 1992). Otros investigadores han determinado cambios en cultivos celulares de miocardiocitos de embrión de pollo de 14 días y se observa que la tropomiosina es más abundante en la fracción citoplasmática que en la fracción del citoesqueleto (Muros MA. y cols., 1992).

Se han realizado estudios para determinar la concentración de tropomiosina, actina, desmina y vimentina de miocardiocitos de pollo tratados con 12-*o*- tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TP A), 5-azacytidine (AZA gamma interferon (INF) y diacylglicerol (DAG). Estos tres agentes modifican la distribución de las proteínas tropomiosina y actina, incrementando su concentración citoplásmica y disminuyendo su concentración en el citosol (Muros MA. y cols., 1994).

Basándose en estos antecedentes se piensa que los derivados de los ácidos fibricos pudieran modificar de alguna forma la organización y el contenido de algunas proteínas del citoesqueleto de los miocardiocitos de ratas. Estas alteraciones pudieran a su vez estar relacionadas con algunos de los efectos secundarios de estos fármacos.

Cultivos celulares. En los últimos años los modelos *in vitro* han cobrado una extraordinaria importancia y la tendencia a usarlos ha sido en forma ascendente.

Los cultivos celulares *in vitro* se utilizan ampliamente; mientras que las líneas celulares establecidas pueden cultivarse indefinidamente. Otros modelos *in vivo* tienen un tiempo de vida limitado. Los cultivos celulares primarios ofrecen varias ventajas sobre las pruebas *in vivo*: un daño celular puede ser detectado antes de que el daño en el tejido completo esté presente, además, las complicaciones introducidas por influencias hemodinámicas son eliminadas. Existe una gran variedad de tipos de investigaciones llevadas a cabo mediante cultivos celulares tales como: 1) Actividad intracelular: Replicación y transcripción del ácido desoxiribonucleico (DNA), síntesis de proteínas, metabolismo de energía. 2) Flujo intracelular: Movimiento del RNA del núcleo al citoplasma, receptores de hormonas, metabolitos. 3) Infecciones, transformación inducida ya sea viral o química, acción de drogas, respuesta a un estímulo externo, secreción de productos especializados. 4) Interacción célula-célula: Uniones celulares, etc.

Sin embargo existen algunas desventajas; las técnicas de cultivo debe ser llevada a cabo bajo estrictas condiciones de esterilidad ya que el crecimiento de células animales es mucho más lento que algunos contaminantes como bacterias, hongos y levaduras. Diferente a algunos microorganismos los cultivos celulares requieren de un medio ambiente complejo para su sobrevivir. El costo de producción de cultivos celulares es mayor que cuando se utilizan animales completos; además de los materiales de laboratorio se requiere personal entrenado y calificado para desarrollar estas técnicas. Por otro lado, la inestabilidad con algunas líneas celulares, aún cuando pueden ser genéticamente estables, la población puede ser heterogénea y puede producir variabilidad de un cultivo a otro.

Las técnicas para el cultivo de células están bien establecidas. Se cultivan en cajas de poliestireno o vidrio, en medios de cultivo de composición definida y se controla la tensión de CO₂, humedad y temperatura (Tarloff y Goldstein, 1994). Por ello los sistemas de cultivos celulares han sido utilizados como modelos celulares para estudiar la cardiotoxicidad inducida por drogas ya que el desarrollo de marcadores de citotoxicidad facilita la evaluación de daños inducidos en ellas (D. Acosta y cols., 1975).

IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD.

El uso del clofibrato como agente hipolipidemiante, tiene efectos secundarios no deseados, tales como la arritmia ventricular, miolisis, miotonía y dolor muscular generalizado que pueden causar problemas de salud a mediano o a largo plazo.

A pesar del uso generalizado del clofibrato, sus efectos a nivel celular no están bien definidos. Una de las posibles causas de los efectos colaterales sobre el corazón es la modificación que este tipo de drogas produce sobre el citoesqueleto.

Se tiene conocimiento que el ácido clofibrico produce alteraciones en el citoesqueleto de miocardiocitos de aves pero se desconoce si ocurren también en mamífero. Por ésto es importante conocer los efectos del clofibrato y del ácido clofibrico sobre miocardiocitos de ratas y directamente sobre cultivos primarios de miocardiocitos en experimentos *in vitro*, ya que el ácido clofibrico es el metabolito activo de muchos agentes hipolipidemiantes.

Estos conocimientos podrían servir de base para relacionar las alteraciones del citoesqueleto con los efectos no deseados del ácido clofibrico y favorecer el diseño de nuevos medicamentos, con los mismos efectos benéficos pero con menores efectos tóxicos.

HIPOTESIS.

El ácido clofibrico y el clofibrato son capaces de alterar el contenido de vimentina y desmina del citoesqueleto de miocardiocitos en ratas tratadas con los compuestos mencionados.

El ácido clofibrico, además es capaz de producir alteraciones *in vitro* sobre cultivos primarios de miocardiocitos de rata.

OBJETIVOS

a. Objetivo general

Determinación *in vivo* e *in vitro* del efecto del clofibrato y del ácido clofibrico sobre el contenido de las proteínas vimentina y desmina en el citoesqueleto de miocardiocitos de rata.

b. Objetivos específicos.

- 1.- Establecer en el laboratorio la técnica para aislar, identificar y cultivar células de miocardiocitos de rata recién nacida.
- 2.- Establecer en el laboratorio los métodos para separar e identificar vimentina y desmina de miocardiocitos de rata Sprague Dawley.
- 3.- Determinar las posibles alteraciones de la distribución y organización de vimentina y desmina en el citoesqueleto de cultivos primarios de miocardiocitos de rata.
- 4.- Conocer las posibles alteraciones en el contenido de vimentina y desmina de corazones de ratas tratadas con clofibrato o ácido clofibrico.

MATERIALES

1.-EQUIPO.

Agitador mecánico con temperatura controlada (New Brunswick Scientific, USA).

Balanza analítica (Sartorius).

Botellas de cultivo de 25 cm² de superficie y tapón de rosca (Falcon C-A. IA)

Cajas para cultivo de poliestireno.

Centrífuga (Damon /IEC, USA) B-20 A (refrigerada), rotor 289.

Centrífuga refrigerada (SORVALL, USA).

Equipo de electroforesis (Bio-Rad, USA).

Equipo de disección.

Espectrofotómetro Carl Zeiss.

Fuente de poder (CAMAG).

Hematímetro (American Optical Scientific Instruments Div USA).

Homogenizador mecánico tipo Elvejem-Potter

Incubadora de CO₂ National, USA)

Lector de microplacas. EIA multi-well- reader (SIGMA, USA).

Microplacas de poliestireno de fondo plano con 6 pozos (SIGMA, USA).

Microplacas de poliestireno de fondo plano con 96 pozos (SIGMA, USA).

Microscopio compuesto (Carl Zeiss).

Microscopio de epifluorescencia con filtros para DAPI, FITC/rojo Texas, Mod. Standard 25.

Microscopio invertido Modelo "D" (Carl Zeiss).

Placa de calentamiento (CORNING, USA, USn).

Potenciómetro (Beckman Century SS-I).

Refrigerador (congelador) a -20 ° C.

Termo-Baño (Felisa).

Vortex (Thermolyne~ USA) T-37600 .

2.- MATERIAL BIOLÓGICO.

In vitro: Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 3 a 5 días de nacidas.

In vivo: Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 20 días de nacidas.

3. ORIGEN DE LOS REACTIVOS.

Biorad. Kit II para determinación de proteínas.

Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA) Tripsina.

ICI de México. Clofibrato.

J.T. Baker (México): Alcohol etílico absoluto, Alcohol metílico, Bicarbonato de sodio.

Lakeside S.A. (México) Penicilina, Sulfato de estreptomicina.

Merck de Alemania: Rojo de fenol, Cloruro de sodio, Sulfato de magnesio, Ácido acético).

Reactivos Monterrey México: Hidróxido de sodio, Hidróxido de potasio, Fosfato monobásico de potasio, Fosfato dibásico de potasio, Ácido clorhídrico, Cloruro de calcio, Cloroformo, Metanol, Cloruro de manganeso.

Sigma Chemical Co. de St Louis, Missouri, US: Dodecil sulfato de sodio, Glucosa, Trisma base, Glicina, MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), PMS (Metasulfato de Fenazina), Tritón X-100, PPO (2,5, Difeniloxazol), Marcadores de peso molecular, Acrilamida, Bis-acrilamida, Lauril-sulfato, Persulfato de amonio, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, TEMED (N'N'N'N'-Tetrametiletildiamina), Amortiguador de muestra, Amortiguador concentrador, Amortiguador separador, Amortiguador de electrodo, Medio de Cultivo CMRL 1066, β -arabino furanoside, ácido clofibrato, suero de bovino fetal y suero de caballo, Anti-desmina D-8281 y Anti-vimentina V-4630, Azul brillante de Coomassie R-250, Colágeno, Trifosfato de Adenosina (ATP), Isopropanol, Tween-20, Ioduro de propidium, BCIP/NTB tabletas (sustrato 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-phosphate/Nitro azul de tetrazolio).

Sigma Immuno Chemical Anti-ratón IgG-fosfatasa alcalina, Anti-ratón IgG-fluoresceína.

Técnica Química (México) Cloruro de potasio.

MÉTODOS

Lavado del material.

El material de vidrio para cultivo se remoja por lo menos 24 h en Cloralex[™] al 1% en agua de la llave, se talla con escobillón y se enjuaga 4 veces con agua de la llave. Se pasa a ácido clorhídrico diluído al 1% con agua de la llave y se talla con escobillón. Se enjuaga vigorosamente con agua de la llave y después se enjuaga tres veces con agua destilada. Las *pipetas serológicas cortas* (Bellco Glass Inc. N.J., USA) y las *pipetas Pasteur* se remojan en PCC-54[™] al 1% en pipeteros de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) al menos por 12 h y después se enjuagan con agua de la llave en un sifón para lavar pipetas (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) por 2 h.

Esterilización.

El *material de vidrio* se coloca boca abajo en canastillas metálicas y se seca en horno a 200 °C. Los *bulbos* usados se colocan en frascos de vidrio con boca ancha y tapa de rosca. Se esterilizan en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Composición y preparación de soluciones.

Ácido clorhídrico 0.04 M en isopropanol (Isopropanol ácido).

Se mezclan 160 µl de HCl 12.5 M con 49.84 ml de isopropanol. Se almacena a temperatura ambiente.

Almacenamiento del medio de cultivo CMRL 1066.

Antes de usar el medio se completa con 10 ml de suero fetal de bovino para tenerlo a una concentración de 10% y 10 ml de suero de sangre de caballo para tenerlo a una concentración de 10% los cuales deben estar estériles y descomplementados. Posteriormente se colocan los frascos a 37 °C por 48 h en prueba de esterilidad y se almacena a 4 °C hasta su uso.

Amortiguador de pH isotónico de tris Salino TD (1X).

Se pesan 8.0 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 0.1 g de Na₂HPO₄ y 3.0 g de Trisma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada. Se agregan 15 ml de HCl 1N y se deja en agitación hasta que la solución adquiera la temperatura ambiente (aproximadamente 15 min). Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml con agua desionizada. Se distribuye en frascos de vidrio, cada uno con 50 ml y se esterilizan en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. Se almacena a temperatura ambiente.

Amortiguador de pH (Buffer F).

Se prepara la solución Tris 2mM, CaCl₂ 0.2 mM, ATP 0.2 mM, 2- Mercaptoetanol 0.2mM, se ajusta el pH 8.0 y se le agrega Tritón -X-100 0.1% inmediatamente antes de su uso.

Colágeno (solución).

Se pesa 1.0 mg de colágeno y se disuelve en 10 ml de ácido acético 0.1 M, lo que equivale a poner 60µl de ácido acético aforar a 10 ml de agua, esta solución se disuelve de 2-3 h a temperatura ambiente.

En un tubo de vidrio se agrega 1 ml de cloroformo y se añade la solución de colágeno (10ml) en la parte superior. La cantidad del cloroformo debe ser 10% del volumen de la solución del colágeno. Se dejar reposar 18 h a 4°C. Asépticamente se remueve la capa conteniendo el colágeno y se coloca en un tubo estéril.

Se cubren perfectamente las cajas con la solución de colágeno estéril y se dejan 8 h a 37°C o toda la noche a 2-8 °C, posteriormente se remueve el exceso de colágeno y se deja secar toda la noche. Al momento de utilizar las cajas de cultivo se enjuagan con agua estéril.

Electroinmunotransferencia (Soluciones).

Amortiguador de transferencia. Se prepara la solución de TRIS-base 24.8mM, glicina 192 mM, Metanol al 10% y se ajusta el pH 8.3.

Solución bloqueadora. Se prepara la solución Tris 20 mM, NaCl 0.9%, leche sin grasa 10% se agrega justo antes de su uso.

Amortiguador Tris Salino (TBS). Tris 20 mM, NaCl 500 mM a pH 7.5, se almacena a 4°C.

Amortiguador Tris -Salino-Tween (TTBS). Tris 20 mM, NaCl 500 mM a pH 7.5 con Tween-20 0.05%, se almacena a 4°C.

Anticuerpo primario (anti-vimentina o anti-desmina) a una concentración de 1:100 diluido en TBS.

Anticuerpo Secundario.

(IgG anti-ratón fosfatasa alcalina) a una concentración de 1:250 diluido en TBS.

Estándar de Seroalbúmina Bovina de 1 mg/ml.

Se pesan 0.01 g de seroalbúmina bovina grado RIA y se disuelven en 10 ml de agua Milli-Q. Se distribuyen en fracciones de 1 ml en tubos eppendorf y se almacena a -70° hasta su uso.

Solución de NaCl 40 mM.

Se pesan 2.33 g y se afora en un litro de agua.

Geles de Poliacrilamida (soluciones).

Poliacrilamida (30:0.8). 28.2 g de acrilamida y 0.8 g de *bisacrilamida* se disuelven y se aforaran a 100 ml con agua, la solución se filtra y se almacena en un frasco oscuro a 4°C hasta su uso.

SDS al 10 %. Se pesan 10 g de *docedilsulfato de sodio* y se disuelven en 100 ml de agua.

Amortiguador Tris pH 8.8. Se pesan 8.165 g de trisma base se disuelven en 100 ml agua y se ajusta el pH a 8.8.

Amortiguador-Tris pH 6.8. Se pesan 6.055 g de trisma base se disuelven en 100 ml de agua y se ajusta el pH a 6.8.

Persulfato de amonio 10 %. Se pesan 0.1 g de persulfato de amonio se disuelven en 1 ml de agua.

TEMED comercial.

Amortiguador de cámara. Se mezclan 28.82 g de glicina, 6.04 g de trisma base y 1 ml de SDS al 20 % y se aforan a 2000 ml de agua.

Amortiguador de muestra. Se mezclan 0.45 g de trisma base, 1.2 g de SDS, 6 ml de glicerol, 0.06 g de azul de bromofenol en 21 ml de agua.

Solución fijadora y decolorante. Se mezclan 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético y 500 ml de agua.

Solución colorante. Se pesan 0.1g de azul brillante de Coomassie R250 y se disuelven en 100 ml de la solución fijadora.

Gel de poliacrilamida al 8 y 10 %.

Gel Concentrador (8 %). Se hace una mezcla de las siguientes soluciones:

Agua (5.42 ml), Amortiguador pH 6.8 (1.25ml), Acrilamida-bis-(2.6ml), SDS 10% (0.1ml), Persulfato de amonio (0.1 ml) y TEMED (0.01 ml).

Gel Separador (10%). Se hace una mezcla de las siguientes soluciones:

Agua (4.81 ml), Amortiguador pH 8.8 (1.25ml), Acrilamida-bis (3.3ml), SDS 10% (0.1ml), Persulfato de amonio (0.1 ml) y TEMED (0.01 ml).

Mezcla de antibióticos 100 X (Penicilina 200,000 UI; Estreptomicina 0.5 g).

La mezcla se prepara a partir de frascos de Penicilina G-sódica cristalina (Lakeside) de 1×10^8 unidades y sulfato de estreptomicina (Lakeside) de 1 g. Se disuelven los componentes en forma individual en 2 ml de agua desionizada. Se toman 0.4 ml del frasco de penicilina y se mezclan con 1 ml de la solución de estreptomicina, esta mezcla se afora a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza por filtración. Se almacena en fracciones de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca a -20 °C.

MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a 2 mg/ml.

Para 10 ml se pesan 0.02 g de MTT y se disuelven en SSB. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 μ y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Preparación del medio de cultivo CMRL 1066.

El contenido de un frasco con 9.6 g (Sigma.) se disuelve en 800 ml de agua desionizada conteniendo 2.8 μ g /ml de β -arabino furanoside y posteriormente se añaden 2.2 g de NaHCO_3 . Se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1 N y se agregan 10 ml de una mezcla de penicilina-estreptomicina 100 X. Se afora el volumen a 1000 ml y se esteriliza por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.22 μ (Millipore Corporation, Bedford, MA., USA). Se divide en fracciones de 80 ml en botellas de vidrio estériles, con tapón de rosca. Se colocan los frascos a 37 °C por 48 h en prueba de esterilidad y se almacenan a 4 °C hasta su uso.

Preparación de las drogas:**Para cultivo de células.**

Ácido clofibrato. Pesar 0.021 g disolverlos en un litro de medio de cultivo libre de sueros esterilizar por filtración. Para tener una concentración final de 0.1 mM.

Para tratamiento de las ratas.

Clofibrato. Se disuelve una cápsula (0.30 ml) de una concentración de 600, en 1.7 ml de propilenglicol para tener 300 mg/ml.

Ácido clofibrato. Se pesan 300 mg y se disuelven en un ml de propilenglicol.

PMS (Metasulfato de Fenazina) [3.5 mg/ml].

Para 10 ml se pesan 0.035 g y se disuelven en agua desionizada. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 μ y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Rojo de fenol (solución al 1 %).

Se pesa 1 g de rojo de fenol y se disuelve en 6 ml de NaOH 1N, se afora a 100 ml con agua desionizada. Se filtra a través de papel Whatman #.1 y después se esteriliza por filtración con membranas Millipore de 0.22 μ . Se almacena a -20 °C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Se pesan 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K_2HPO_4 y 0.5 g de KH_2PO_4 . Se disuelven estos componentes en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10N y se afora a 1000 ml. Se distribuye en frascos de vidrio de 100 ml y se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 libras de presión. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución Salina Balanceada de Hanks SSB (1X).

Se pesan 0.07 g de $CaCl_2$, 1.0 g de Glucosa, 7.2 g de NaCl, 0.4 g de KCl, 0.2 g de $MgSO_4$, y 0.12 g de Trisma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 7.0 con HCl 5 N. Se afora a 1000 ml. Posteriormente se ajusta la osmolaridad a 300 ± 10 mOsm con NaCl. Se esteriliza por filtración y se distribuye en fracciones de 100 ml en frascos de vidrio, estériles con tapón de rosca. Se almacena a -20°C.

Suero fetal de bovino y de caballo. Descomplementación y almacenamiento.

El suero se obtiene de Sigma, el suero se sumerge en baño maría a 36 °C hasta descongelarlo y se incuba a 56 °C por 30 minutos. Se distribuye en alícuotas de 100 ml en botellas de vidrio estériles, con tapón de rosca. Se incuban los frascos por lo menos 48 h a 36 °C para comprobar la esterilidad del suero. Se almacenan a -20 °C hasta su uso. *Filtración.* Si el suero se observa turbio se filtra a través de una serie de membranas desde 10, 8, 5, 3, 1, 0.8, 0.4 y 0.22 μ , utilizando vacío, en condiciones asépticas.

Tripsina al 1.0 % (concentrado).

Se pesan 1.0 g de tripsina 1:250 (*Diffco*) y se disuelven en 100 ml de agua desionizada fría. Se deja a 4 °C en agitación lenta toda la noche, después se filtra a través de papel Whatman # 1 utilizando un embudo Büchner y posteriormente se esteriliza por filtración con membranas Millipore de 0.22 μ . Se distribuye en fracciones de 10 ml y se almacena a -20 °C.

Tripsina-TD 0.1% (1X).

En frascos que contienen 50 ml de TD 1X estéril, se mezclan bajo condiciones asépticas los reactivos previamente esterilizados, en el siguiente orden: 5 ml de la solución de tripsina al 1.0%, 0.3 ml de rojo de fenol al 1%, y 0.5 ml de la solución de penicilina-estreptomicina (100 X). Se distribuye en alícuotas de 10 ml en tubos con tapón de rosca estériles. Se toman al menos tres tubos, al azar, del lote recién preparado y se incuban a 36 °C por 48 h para comprobar su esterilidad. Se almacena a -20°C.

Soluciones para marcaje de células.

Amortiguador PBS salino. Na H₂PO₄ 0.2 mM, Na₂ H PO₄ 0.2 mM, NaCl 0.9%.

Amortiguador de PBS salino con MnCl₂ 2 mM. Se pesan 0.5959 g de MnCl₂ para un litro de la solución de PBS.

PBS salino con MnCl₂ 2 mM, EDTA 10 mM. Se pesan 3.72 de EDTA en 1000 ml de la solución de PBS salino con MnCl₂ 2mM a pH 6.9.

Solución de formaldehído 4.0%, con Tritón X-100 al 0.05%. Se disuelven 4 ml de formaldehído (concentrado) en 100 ml de agua destilada, con 50 μ l de Tritón-X-100.

Solución fijadora con Metanol:cloroformo 1:3. Se mezcla una parte de metanol por 3 de cloroformo.

Preparación del primer anticuerpo anti-desmina o anti-vimentina diluido en amortiguador PBS MnCl₂ 2mM (1:100). Se diluyen 10 μ l del anticuerpo con 1000 μ l de buffer (500 μ l es suficiente).

Solución de PBS MnCl₂ 2 mM con Tween 20 al 0.1% . Se agregan 0.1 ml de Tween 20 a la solución PBS MnCl₂ 2 mM.

Preparación del anticuerpo secundario anti-ratón-flouresceína (1:50). Se disuelven 10 µl del anticuerpo en 500 µl de PBS MnCl₂ 2mM.

Ioduro de propidio (1µg/ml). Se disuelve 100µg de ioduro de propidio en 10 ml de agua y a partir de esa solución se hace una dilución.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO MEDIANTE DOS ETAPAS: Experimentación *In vitro* y experimentación *In vivo*.

EXPERIMENTACIÓN: *In vivo*

Los animales de experimentación se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno.

Tratamiento de los animales con clofibrato y ácido clofibrico.

Los animales de experimentación se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno. El primer grupo se mantuvo como control sin tratamiento, al segundo grupo se le administró diariamente, por vía oral, ácido clofibrico a dosis de 300 mg/kg de peso mediante una cánula esofágica por 30 días. El tercer grupo se le administró clofibrato a dosis de 300 mg/kg de igual manera que el anterior. El vehículo utilizado fue propilenglicol.

A los 30 días de iniciado el experimento las ratas se sacrificaron, aplicando por vía intraperitoneal 50 mg/kg de peso de pentobarbital sódico (Anestesal), a cada una de ellas se les extrajo el corazón y se procedió a procesarlo para obtener las proteínas insolubles en Tritón X-100 y analizarlas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Preparación de las muestras a partir de corazón para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida.

Cada uno de los corazones se procesó de manera independiente, el corazón se colocó en PBS y se cortó en trozos de 3 a 5 mm, se lavó con 10 ml NaCl 40 mM para eliminar el exceso de sangre, se *homogeneizaron* en agua-hielo, con un homogenizador tipo Elvehjem-Potter, la pastilla se lavó con 10 ml de buffer F (TRIS 2mM, CaCl₂ 0.2mM, ATP 0.2 mM, 2- Mercaptoetanol (2-ME) 0.2 mM, pH 8 y Tritón X-100 al 0.1%. La suspensión se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, y se conservó la pastilla la cual corresponde a la fracción insoluble en Tritón X-100, constituida principalmente por proteínas del citoesqueleto se decantó y se resuspendió con 10 ml de buffer F, una porción del pellet finalmente se utilizó para determinar el contenido de proteína y se ajustó a una concentración final de 1µg/µl con buffer de muestras. Después las preparaciones se calentaron en agua hirviendo, por 3 min. Estas preparaciones se usaron inmediatamente o se almacenaron a -70°C, hasta su uso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El primer paso de esta técnica consistió en separar las proteínas a partir de muestras de acuerdo con su tamaño y carga aplicándole una corriente eléctrica. De tal modo que una muestra de un peso molecular desconocido puede ser comparada directamente con un carril adyacente el cual contiene marcadores de peso molecular estándar.

Preparación y corrimiento del gel.

Se prepararon los geles de poliacrilamida al 10% y 8% (Ver página 21 de la sección de métodos).

- Se ensamblaron los vidrios de 10 x 8.3 y 10 x 7.3 cm con los separadores de 0.75 mm y se sujetaron cada lado con pinzas, se preparó la mezcla para el gel

separador 10 % y se agitó suavemente se vació la mezcla con una pipeta y se agregaron unas gotas de agua por la parte superior de la solución para dar una terminación homogénea a la parte superior del gel separador, se dejó que polimerice.

- Posteriormente se inclinaron las placas para eliminar el agua sobrante y se adicionó la mezcla del gel al 8 % e inmediatamente después se colocó el peine y se dejó hasta su polimerización, lo cual tardó de 10 a 15 min.
- Se retiró el peine y se colocó en la cámara para electroforesis, cada una de las celdillas se cargaron con 25 μ l (1 μ g/ μ l), se retiró el separador de abajo y se colocó en la cámara. Después se vació el buffer de corrida se colocaron los electrodos, se conectó a la fuente de poder y se aplicó una corriente de 100 V por 1 h.
- Uno de los geles se colocó en un recipiente conteniendo azul de Commassie R-250 al 0.1 % en solución fijadora (Metanol:ácido acético:agua 40:10:50) y luego se decoloró con solución fijadora, el otro gel se colocó en una vasija y se lavó con 20 ml de Tritón X-100 al 2.5 %, 2 veces por 20 min cada vez, se decantó la solución y se dejó en amortiguador de transferencia por 24 h a temperatura ambiente, este gel se utilizó para llevar a cabo la electrotransferencia.

Electrotransferencia y detección de vimentina o desmlna (Towin H., 1979).

Método. La membrana de nitrocelulosa se cortó a las mismas dimensiones que el gel, se cortaron 2 piezas de papel filtro a las mismas dimensiones y 2 piezas de Scotch Brite^{MR} y se colocaron en un recipiente conteniendo amortiguador de transferencia para saturarlos por un tiempo mínimo de 30 min. Se colocaron en el contenedor especial para la electrotransferencia y se hizo un sandwich poniendo primero la pieza de Scotch Brite^{MR} luego el papel filtro, el gel, la membrana, el papel filtro y finalmente la pieza de Scotch Brite^{MR}.

Las proteínas se electrotransferieron a papeles de nitrocelulosa, aplicando una corriente constante de 150 V por 1 h. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa se lavaron con 20 ml TTBS por 5 minutos, se decantó la solución y se agregó TBS para enjuagar el exceso de Tween, luego se agregaron 20 ml de leche Sveltes^{MR} al 2% en solución bloqueadora la cual sirve para unirse a sitios sobre el filtro de nitrocelulosa que no fue ocupada por proteínas transferidas del gel, posteriormente se lavó la membrana 2 veces con solución de TTBS por 5 minutos cada vez. Luego se enjuagó con TBS por 5 min y posteriormente se colocó 10 ml de la solución de anticuerpo primario (anti-vimentina o anti-desmina) a una concentración de 1:100 diluido en solución bloqueadora sin leche y se dejó ésta por 24 h a temperatura ambiente. Luego se decantó la solución del anticuerpo y se lavó la membrana con 10 ml de TTBS 2 veces por 5 min cada vez, luego se lavó con 10 ml de TBS 3 veces por 5 min. Seguido de esto se colocó el segundo anticuerpo (IgG anti ratón fosfatasa alcalina) diluido 1:250 con solución bloqueadora sin leche y se incubó por 2 ½ h a temperatura ambiente, se decantó el segundo anticuerpo y se le agregó 20 ml de TTBS para lavar la membrana por 15 min. Después se decantó la solución y se agregó TBS para enjuagar y eliminar los residuos de Tween 20.

Se eliminó la solución y se le añadió el sustrato el cual es una pastilla de BCIP/NTB disuelta en 10 ml de agua y se observó hasta que aparecieron las bandas lo cual requirió de unos cuantos segundos (aproximadamente 30 seg).

Análisis densitométrico de desmina y vimentina.

Los geles y las membranas de nitrocelulosa que fueron previamente electrotransferidas a partir de los geles, fueron fotografiados con un rollo ASA 100 y a partir de los negativos se hicieron positivos y se obtuvieron filminas de un tamaño de 10 x 15 cm, se colocaron en el densitómetro (Beckman Apprasie Junior) y se leyó a una longitud de onda de 520 nm. Los resultados fueron obtenidos mediante un programa computacional integrado al densitómetro

EXPERIMENTACION: *In vitro*

Obtención del cultivo de células.

Monocapa.- Veinte ratas se sacrificaron en condiciones de esterilidad mediante dislocación cervical, se obtuvieron los corazones de cada una y se colocaron en una caja de petri conteniendo PBS, se cortaron en pequeños fragmentos de 3 a 5 mm, se colocaron un matraz Erlenmeyer con capacidad de 25 ml posteriormente se les adicionaron 20 ml de tripsina (0.1%) estéril y se incubaron por 18 h a 4°C se dejó para que sedimente el tejido y cuidadosamente el sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur, la suspensión se incubó a 36.5°C por 30 min, posterior a esto se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo CMRL 1066, suplementado con suero fetal de bovino 10% y suero de caballo 10 %, se tomó una gota con una pipeta Pasteur, se colocó en un hemacitómetro y se determinó el número de células por mililitro, el resto de las células se completaron con medio y se disgregaron. Luego se colocaron en 5 placas de poliestireno de 25 cm² previamente cubiertas con colágeno (ver preparación de soluciones página 20) a una concentración 2×10^5 células por ml. Finalmente se incubaron a 36 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta que se formó la monocapa lo cual suele tomar unos 10 días. Después de haberse formado la monocapa se cambió el medio cada 48 h.

Verificación de la viabilidad celular.

La viabilidad celular se monitorea de la siguiente forma; a una porción o gota de células obtenidas de cultivos primarios se les añadió una gota de azul de tripan y se colocó en un hemacitómetro. La exclusión de colorante se observó mediante microscopio de luz invertido, esto permitió la evaluación de las células vivas calculando el porcentaje de éstas que son capaces de tomar o excluir el colorante.

Tratamiento de las células con ácido clofibrico.

Se preparó una solución de ácido clofibrico de 0.1 mM diluido en el medio de cultivo CMRL 1660, esta solución se agregó a las cajas de cultivo de poliestireno de 3 x 4 cm² con una monocapa de células ya formada, se incubaron por 24 h a 36°C. De igual manera se colocaron células omitiendo las drogas y estas cajas fueron utilizadas como controles.

Determinación del porcentaje de citolisis inducida por el ácido clofibrico mediante la técnica de MTT.

Esta técnica se basa en la reducción de la sal de tetrazolio a formazan por enzimas deshidrogenasas de células vivas. A partir de un cultivo de células se decantó el medio de cultivo, se adicionó tripsina (1.5 ml) y se incubó 37°C por 3 min con la finalidad de disgregar las células, se pasaron a un tubo cónico, se centrifugaron a 700 rpm por 10 min, se decantó el medio de cultivo para lavar y resuspendió la pastilla nuevamente en medio, se centrifugó 10 min a 700 rpm y se colocó una gota en la cámara de Neubauer, se contó el número de células/ml y se ajustó su densidad a 150,000 células/ ml. Estas células se inocularon (200 µl, aproximadamente 30,000 cels/pozo) en las placas. Finalmente se incubaron 24 h a 36°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %.

Se utilizaron cinco pozos para cada uno de los tratamientos, a partir de las monocapas formadas en las microplacas se lavó dos veces adicionando 200 µl SSB, se agitó suavemente y se decantó por inversión. Después se agregó 25 µl SSB a los cinco tubos de esta serie los cuales sirvieron de control negativo, a la siguiente serie de 5 tubos se les agregaron 25 µl de Tritón y sirvió como control positivo, finalmente a la ultima serie se les agregaron 25µl de ácido clofibrico 0.1 mM en este caso sirvió de tratamiento. Se incubaron 24 h a 36°C se lavaron nuevamente con 200µl SSB y se decantó, se agregaron 50 µl MTT + 50 µl PMS, se incubaron 75 min a 36°C , se lavaron con 200 µl SSB y se decantó, finalmente se agregaron 200 µl isopropanol acidificado (HCl 0.04M) y se dejó reposar 5 min, luego se resuspendió vigorosamente

el alcohol con una pipeta de repetición, se pasó el sobrenadante a una placa nueva y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas (EIA Multiwell Reader, Sigma Diagnostics) a 545 nm con un filtro, se calculó el porcentaje de viabilidad graficando los datos experimentales y considerando un grupo control, con SSB (100% de células vivas) contra un grupo tratado con Tritón X-100 al 0.1% (100% de muerte celular).

Determinación de proteínas totales (Bradford M., 1976).

- a) Se colocaron por triplicado las siguientes soluciones: solución estándar 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml en un volumen de 800 µl.
- b) Los homogenados o las muestras problema se determinaron por triplicado agregando 800 µl a cada tubo.
- c) A cada tubo se le agregaron 200 µl del reactivo concentrado del Kit y se agitó vigorosamente en un vortex.
- d) Se incubó al menos cinco minutos y no más de 1 h.
- e) Finalmente se midió la absorbancia a 595 nm.

Preparación de las muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida a partir de cultivos primarios de miocardiocitos.

A partir de las monocapas de células tratadas y las de los testigos, el medio de cultivo se decantó después de 24 h, las monocapas se lavaron con NaCl 40 mM, con una pipeta Pasteur se despegaron las células y se colocaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos, la pastilla se lavó con 500 µl de buffer F (TRIS 2mM, CaCl₂ 0.2mM, ATP 0.2 mM, 2- Mercaptoetanol, (2-ME)) 0.2 mM, pH 8 y Tritón X-100 al 0.1%. La suspensión se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, la pastilla corresponde a la fracción insoluble en Tritón X-100, constituida principalmente por proteínas del citoesqueleto y se homogeneizaron en agua-hielo, con un homogenizador tipo Elvehjem-Potter. El homogenado se lavó con 500 µl de buffer F (TRIS 2mM, CaCl₂ 0.2mM, ATP 0.2 mM, 2- Mercaptoetanol (2-ME) 0.2 mM, pH 8 se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm y se decantó. Una porción del pellet finalmente se utilizó para determinar el contenido de proteína y ajustarla a una

concentración de 1µg/µl con buffer de muestras. Después las preparaciones se calentaron en agua hirviendo, por 3 min. Estas preparaciones se usaron inmediatamente o se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizó el mismo procedimiento que en los experimentos *in vivo* (página 22 de la sección de métodos).

Electrotransferencia y detección del anticuerpo.

Se utilizó el mismo procedimiento que en los experimentos *in vivo* (página 29 de la sección de métodos).

Análisis densitométrico de desmina y vimentina.

Las membranas de nitrocelulosa que fueron previamente electrotransferidas a partir de los geles, fueron fotografiadas con un rollo ASA 100 y a partir de los negativos se hicieron positivos y se obtuvieron filminas de 10 x 15 cm, se colocaron en el densitómetro (Beckman Apprasie) y se leyeron a una longitud de onda de 520 nm. Los resultados fueron obtenidos mediante un programa computacional integrado al densitómetro.

Inmunofluorescencia. Marcaje con anticuerpos de las células de miocardiocitos.

A partir de un cultivo celular primario de células de miocardiocitos de rata se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

1. Las células se lavaron dos veces en agitación por tres minutos cada vez con 0.5 ml del Amortiguador (PBS, EDTA 10 mM, MnCl₂, pH 8.2)
2. Se fijaron a temperatura ambiente con formaldehído 4.0%, Tritón 0.05% por 15 min.
3. Nuevamente se fijaron por 5 min con Metanol:Ácido acético 1:3, agitando suavemente.

4. Se lavaron por 10 min. Con 0.5 ml de PBS, $MnCl_2$ 2 mM.
5. Luego se agregó el primer anticuerpo (Anti-vimentina o anti-desmina) diluido en PBS $MnCl_2$ (1:100) se incubó a 37 °C por 25 min (500 μ l fue suficiente).
6. Se lavaron con PBS $MnCl_2$ Tween 20 0.1% por 5 min.
7. Se incubaron con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón conjugada con fluoresceína) diluido en PBS $MnCl_2$ (1:50) por una hora a 37° C (500 μ l fue suficiente).
8. Se lavaron por 5 min con PBS $MnCl_2$, Tween 20 (0.1%).
9. Se contrastaron con yoduro de propidio (1 μ g/ml) agregando una pequeña gota.
10. Finalmente se observaron al microscopio epifluorescente, se les añadió constantemente PBS para evitar que se secan. A los dos días la malla de la desmina y vimentina se observa con mayor claridad. Se fotografiaron las células en microscopía de Epifluorescencia con un microscopio Axiophot GZEISS con filtros de triple banda DAPI, FITC y Rojo Texas con rollo Fuji Asa 100 manualmente con un tiempo de exposición de 30 segundos.

RESULTADOS.

EXPERIMENTOS *in vivo*

I. EFECTO DEL CLOFIBRATO Y DEL ÁCIDO CLOFÍBRICO SOBRE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO DE CORAZÓN INSOLUBLES EN TRITÓN X-100.

Modificación de los patrones electroforéticos de proteínas totales del citoesqueleto.

Se analizaron en geles de PAA-SDS las proteínas insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de células aisladas de corazón de un grupo de ratas sin tratamiento; de un grupo tratado con clofibrato y de un grupo de ratas tratadas con ácido clofibrico

La figura 1 muestra los patrones electroforéticos de extractos de células de corazón con distintos tratamientos. Se observa que hay una disminución en las bandas que corresponden a la vimentina y desmina de extractos de células obtenidos de animales tratados con ácido clofibrico; en muestras obtenidas de animales tratados con clofibrato no se observa ningún cambio aparente comparados con la de los testigos sin tratamiento.

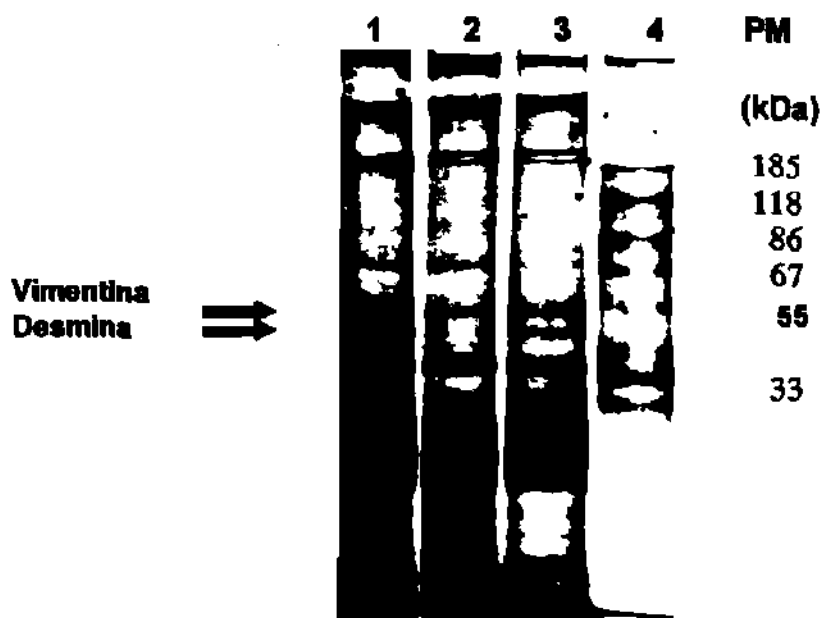


Fig. 1 Cambios en los patrones electroforéticos de proteínas totales insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de miocardiocitos de ratas tratadas con clofibrato o ácido clofibrico. Ratas de 20 días de nacidas se trataron con clofibrato o ácido clofibrico (300 mg/kg de peso), diariamente, durante 30 días. Después se anestesiaron con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal y se les extrajo el corazón. Cada uno de los corazones se cortó en trozos de 3 mm aproximadamente, después las muestras se homogeneizaron. Las

preparaciones se lavaron y centrifugaron tres veces con PBS y se disolvieron con Tritón X-100 al 0.1 %. De cada una de las muestras disueltas en amortiguador de muestras se aplicaron 25 µg de proteína en cada uno de los carriles y se llevó a cabo la electroforesis en geles de PAA. El carril 1 corresponde al extracto de células tratadas con clofibrato, el carril 2 al extracto de células tratadas con ácido clofibrico, el carril 3 al extracto de células sin tratamiento y el carril 4 contiene los marcadores de peso molecular. La flecha superior señala la banda correspondiente a la vimentina y la flecha inferior señala la banda correspondiente a la desmina.

Análisis densitométrico de los patrones electroforéticos de proteínas totales del citoesqueleto de miocardiocitos.

La figura 2 muestra los densitogramas de los patrones electroforéticos de proteínas totales insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de miocardiocitos de ratas sin tratamiento, tratadas con ácido clofibrico y de ratas tratadas con clofibrato. La flechas en las figuras b y c indican el sitio que corresponde a la vimentina (superior) y desmina (inferior). Obsérvese que el área bajo la curva del densitograma (b) que corresponde a extractos de células de corazón de rata tratados con ácido clofibrico, hay una disminución significativa de las bandas señaladas con respecto al control sin tratamiento (a). En el densitograma (c) correspondiente a los extractos de células tratadas con clofibrato, no se observa ninguna alteración aparente en las bandas de vimentina y desmina, comparado con el control sin tratamiento (a).

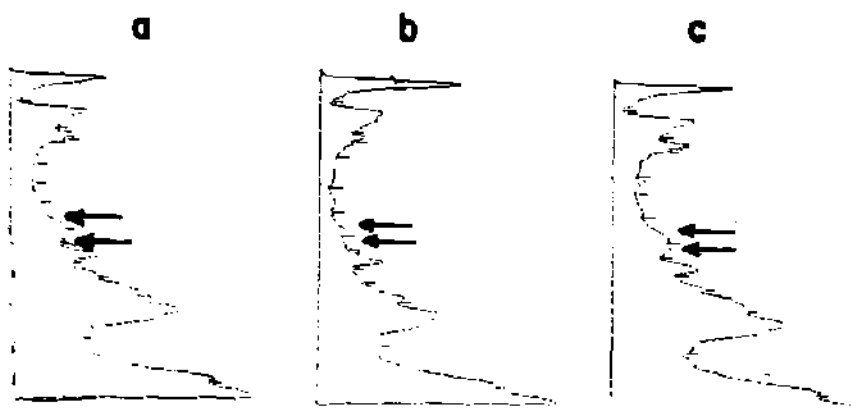


Fig. 2 Densitometría de los patrones electroforéticos de proteínas totales insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de miocardiocitos de ratas a diferentes tratamientos. Las letras en las figuras corresponden: (a) extractos de miocardiocitos obtenidos de ratas sin tratamiento, (b) contiene muestras de animales tratados con ácido clofibrico (300 mg/Kg peso) y (c) tratados con clofibrato (300 mg/Kg peso). Los geles fueron fotografiados con una película Kodak ASA 200 y a partir de los negativos se hicieron positivos en filminas de 10 x 15 cm, se colocaron en el densitómetro Beckman Appraise Junior y se leyeron a una longitud de onda de 520 nm.

Análisis densitométrico de los patrones electroforéticos de proteínas totales del citoesqueleto.

En la Tabla 1 se presentan los datos del área bajo la curva de los densitogramas obtenidos a partir de los geles de PAA. Estos datos fueron obtenidos por análisis densitométrico como se describió en la página 30 de la sección de métodos. En los valores que corresponden a las células de corazón de ratas tratadas con ácido clofibrico se observó una disminución estadísticamente significativa con respecto al control, mientras que en las muestras de animales tratados con clofibrato los valores permanecieron sin cambios significativos comparados con los valores correspondientes a muestras sin tratamiento.

Tabla 1. Disminución del área bajo la curva de los densitogramas de las proteínas del citoesqueleto vimentina y desmina.

Proteínas	Área bajo la curva (m^2)		
	Sin tratamiento	Ácido clofibrico	Clofibrato
Vimentina	4.7 \pm 0.5	2.6 \pm 0.34*	4.1 \pm 0.37
Desmina	2.36 \pm 0.32	1.73 \pm 0.09*	2.06 \pm 0.34

* $p < 0.05$, con respecto a los resultados de los testigos sin tratamiento.

$n=5$

Se analizaron las bandas correspondientes a la vimentina y desmina a partir de los geles de PAA-SDS. Los datos se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA).

Disminución de la densidad de vimentina de miocardiocitos de ratas tratadas con ácido clofibrico o clofibrato.

Para identificar y cuantificar las bandas que representan la vimentina o la desmina, obtuvimos los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida, posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos monoclonales específicos acoplados a fosfatasa alcalina.

La figura 3 muestra una disminución aparente en la intensidad de la banda correspondiente a la vimentina de los extractos obtenidos de animales tratados con ácido clofibrato (carril 2). En las muestras que corresponden a animales tratados con clofibrato (carril 3) también se observa un cambio importante en la intensidad de la banda si se compara con el control sin tratamiento. Se pudo comprobar mediante el análisis densitométrico que esta alteración es estadísticamente significativa en ambos casos (Tabla 2).

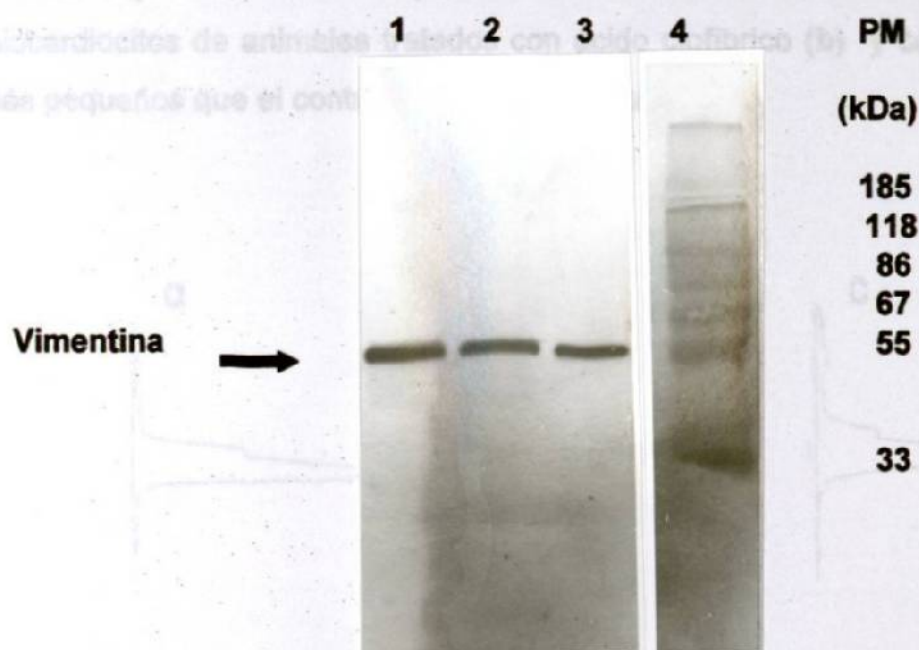


Figura 3. Disminución de la densidad de la banda de vimentina en patrones electroforéticos de proteínas del citoesqueleto en animales tratados con clofibrato y ácido clofibrato. Cada uno de los carriles se cargó con 25 μ g de proteínas. Las proteínas del citoesqueleto insolubles en Tritón X-100 se separaron mediante geles de PAA-SDS, se electrotransfirieron a papeles de nitrocelulosa y se aplicó una corriente de 150V por 1 hora. Luego las membranas se impregnaron en solución bloqueadora conteniendo leche Sveltes^{MR} 2% y se lavaron con solución de TTBS y TBS. Posteriormente se colocaron con la solución del anticuerpo primario (anti-vimentina) diluido en solución bloqueadora a una concentración de 1:100 y se incubaron por 24 h a temperatura ambiente. La solución del anticuerpo se decantó y se lavaron las membranas con TTBS y TBS. Luego se colocó el segundo anticuerpo (IgG anti-ratón fosfatasa alcalina) diluido 1:250 y se incubó por 2.5 h a temperatura ambiente, se decantó ésta solución y las membranas de nitrocelulosa se lavaron sucesivamente con TTBS y TBS. Se le añadió a las preparaciones el sustrato (BCIP) y se observaron los geles hasta que aparecieron las bandas (lo cual ocurrió a los 30 segundos), finalmente se paró la reacción con agua bidestilada. El carril 1 corresponde, a extractos de células de ratas sin tratamiento; el carril 2, a extracto de células de ratas tratadas con ácido clofibrato (300mg/Kg); el carril 3, a extractos de células de ratas tratadas con clofibrato (300 mg /kg); y el carril 4, corresponde a marcadores de peso molecular.

Análisis densitométrico de vimentina en miocardiocitos de ratas tratadas con clofibrato y ácido clofibrico.

La figura 4 muestra los densitogramas obtenidos a partir de las membranas de nitrocelulosa que fueron previamente electrotransferidas y reveladas con anticuerpos específicos acoplados a fosfatasa alcalina. Este experimento se realizó utilizando las muestras que se obtuvieron en la figura 3. Obsérvese que en los densitogramas b y c el área bajo la curva correspondiente a la vimentina, obtenidos de extractos de miocardiocitos de animales tratados con ácido clofibrico (b) y con clofibrato (c), son más pequeños que el control sin tratamiento (a).

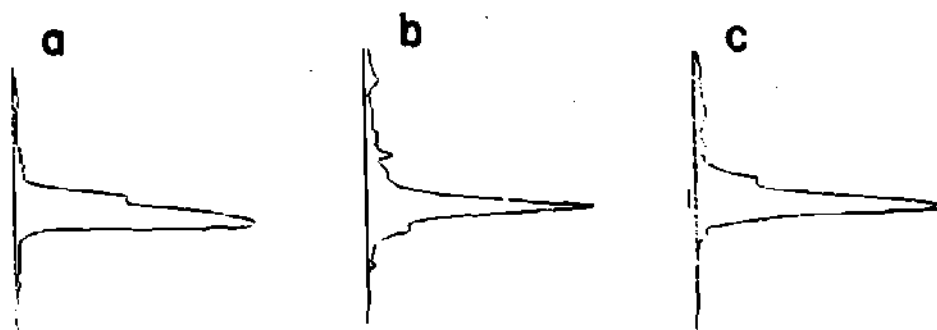


Figura 4. Perfil densitométrico de la vimentina. Las letras en las figuras corresponden: (a) extracto de miocardiocitos de ratas sin tratamiento, (b) tratadas con ácido clofibrico a dosis de 300 mg/kg de peso y (c) tratadas con clofibrato a dosis de 300 mg/kg de peso. Las membranas de nitrocelulosa fueron fotografiadas con una película Kodak ASA 200 y a partir de los negativos se hicieron positivos en filmillas de un tamaño de 10 x 15 cm, para analizarlas se colocaron en el densitómetro Beckman Appraise Junior tal como se describió en la figura 2.

Disminución de la densidad de desmina en miocardiocitos de animales tratados con clofibrato o ácido clofibrico.

La figura 5 muestra las bandas que corresponden a la inmunolocalización de la desmina. Obsérvese que en los carriles 1 y 2 que corresponden a muestras obtenidas de ratas tratadas con clofibrato y ácido clofibrico respectivamente, hay una disminución en la intensidad de las bandas si se compara con el control sin tratamiento (carril 3).

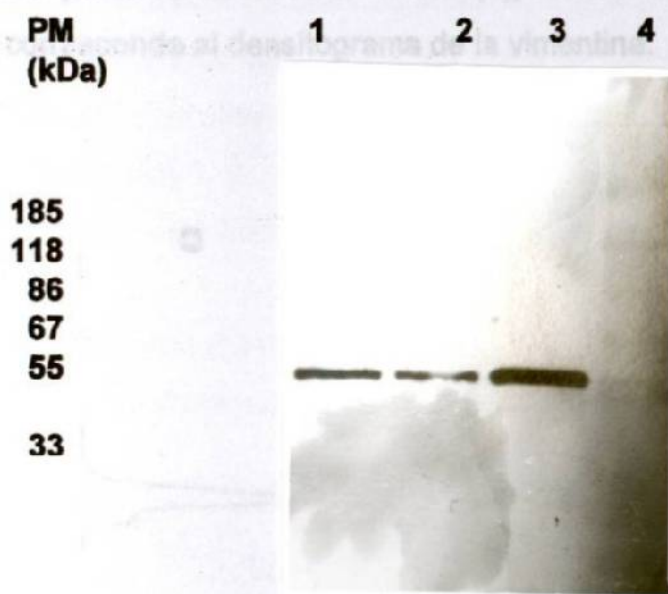


Figura 5. Disminución de la densidad de la banda de desmina en patrones electroforéticos de proteínas del citoesqueleto en animales tratados con clofibrato y ácido clofibrico. El experimento llevado a cabo para la detección de desmina se realizó de igual forma que el descrito en el pie de la figura 3, pero en lugar de usar anticuerpos anti-vimentina se usaron anticuerpos anti-desmina. El carril 1 corresponde a extracto de células de ratas tratadas con clofibrato (300 mg/Kg de peso); el carril 2 a extracto de células de ratas tratadas con ácido clofibrico (300 mg/Kg de peso); el carril 3 a extracto de células de ratas sin tratamiento; y el carril 4, marcadores de peso molecular

Análisis densitométrico de la banda de desmina en ratas tratadas con clofibrato o ácido clofibríco.

En la figura 6 se muestran los densitogramas obtenidos a partir de las membranas de nitrocelulosa correspondientes a las bandas de desmina. Obsérvese que el área bajo la curva el densitograma correspondientes a los extractos de miocardiocitos de animales tratados con ácido clofibríco (b) y clofibrato (c) son más pequeños que el control sin tratamiento (a), tal como se observó también en la figura 4 la cual corresponde al densitograma de la vimentina.

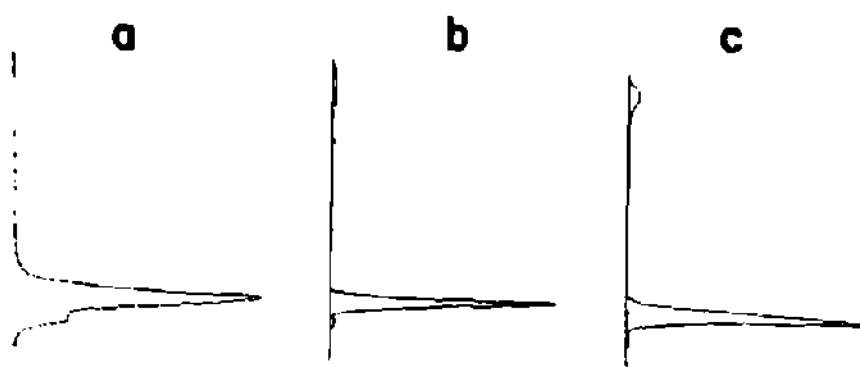


Figura 6. Perfil densitométrico de la desmina. Se obtuvieron los densitogramas de las bandas inmunolocalizadas de desmina, en la misma forma que se hizo con vimentina (figura 4). Las membranas se fotografiaron en una película Kodak ASA 200 y se obtuvieron filminas se analizaron en un densitómetro Beckman Appraise Junior. Las letras en los recuadros corresponden a cada uno de los tratamientos: (a) extractos de células de ratas sin tratamiento, (b) extractos de células de ratas tratadas con ácido clofibríco a dosis de 300 mg/Kg de peso y (c) tratadas con clofibrato a dosis de 300 mg/kg de peso.

Análisis densitométrico de la vimentina y desmina identificadas mediante electroinmunotransferencia de corazón de ratas tratadas con ácido clofibrato y clofibrato.

La Tabla 2 representa los datos del área bajo la curva de los densitogramas obtenidos a partir de las membranas de nitrocelulosa. Estos datos fueron obtenidos por análisis densitométrico. Se observó una disminución en las bandas de vimentina y desmina en muestras de ratas tratadas con ácido clofibrato o clofibrato. A pesar de que en la tabla 1 que corresponde a los geles de PAA solo se ve una diferencia en las muestras de animales tratados con ácido clofibrato, se pudo comprobar mediante la inmunolocalización y densitometría que el efecto es significativo tanto para el tratamiento con el ácido clofibrato como con el clofibrato.

Tabla 2. Disminución de las bandas de vimentina y desmina por efecto del ácido clofibrato y clofibrato.

Proteínas	Area bajo la curva(m²)		
	Sin tratamiento	Ácido clofibrato	Clofibrato
Vimentina	7.88±0.6	4.9±0.16*	5.32± 0.7*
Desmina	6.14± 0.05	2.39±0.02*	3.58± 0.07*

*P<0.05 con respecto a los resultados de los controles sin tratamiento.

n=5

Se analizaron las bandas inmunolocalizadas con anticuerpos específicos de anti-vimentina y anti-desmina. El experimento se llevó a cabo igual al descrito en la tabla 1, pero en lugar de utilizar las densitometrías de los geles de PAA-SDS se usaron los resultados que corresponden a las densitometrías de la inmunolocalización de la vimentina y desmina a partir de membranas de nitrocelulosa, descritos de la figura 4 y 6. Los datos se analizaron mediante (ANOVA).

EXPERIMENTOS *in vitro*

II. CULTIVOS PRIMARIOS DE MIOCARDIOCITOS DE RATA.

La figura 7 muestra un cultivo primario de miocardiocitos de rata sin tratamiento. Las células obtenidas de animales de 3 días de nacidos recién inoculadas tenían forma redonda y con el microscopio invertido podía observárseles latiendo. Las células comenzaron a adherirse a la superficie de las cajas de cultivo en las siguientes 24 h y adquirieron forma triangular que es típica en estas células. Algunas de ellas adoptaron formas irregulares. El tamaño promedio de los miocardiocitos era de 15 μm de largo por 3 μm de ancho aunque algunas tenían hasta 30 μm de largo. Las células aisladas llegaron a confluencia a los 10 días de incubación. Las células de animales de más 20 días de nacidos permanecieron redondeadas varios días después de inocularse y no fueron capaces de unirse a la superficie de las cajas de cultivo. La mayoría de las células tenían un solo núcleo, sin embargo algunas presentaron dos o tres núcleos.

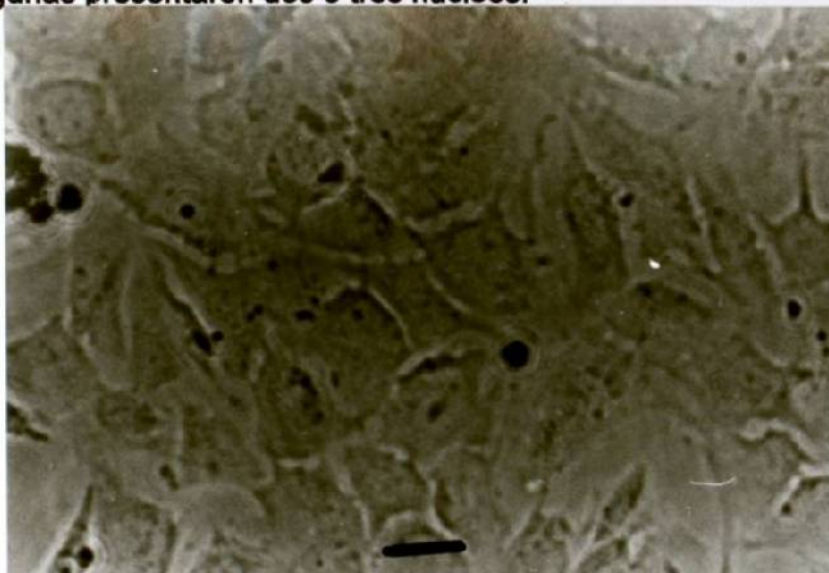


Figura 7. Aspecto del cultivo primario de miocardiocitos normales de rata. Veinte ratas de 3 a 5 días de nacidas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical. Bajo condiciones de esterilidad, se extrajeron los corazones y se cortaron en trozos de 3 mm aproximadamente, se lavaron en PBS y se digirieron en tripsina 0.1 % por 18 h a 4 °C. Luego se inocularon 2×10^6 células por ml en botellas de cultivo de plástico de 25 cm² conteniendo 3 ml de medio de cultivo CMRL 1066. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 % por 5 días. Las fotografías se tomaron con rollo Kodak ASA 200 con un aumento de 400 X. Se muestran varias células con la conformación triangular típica de los miocardiocitos de rata. De cada corazón se logró obtener aproximadamente 1×10^6 células por ml (barra equivale a 10 μm).

Viabilidad celular.

La viabilidad fue determinada en cada experimento; en los cultivos primarios de miocardiocitos sin tratamiento y en cultivos tratados con ácido clofibrico se añadió una gota de azul de tripán a una suspensión de células, la exclusión del colorante se realizó colocando esa mezcla en un hemacitómetro y se observó con un microscopio invertido. Las células muertas no excluyen el colorante, en contraste de las células viables que son capaces de excluirlo y su citoplasma se ve transparente. La viabilidad observada fue de un 98% en todos los casos.

Efecto del ácido clofibrico sobre cultivos primarios de miocardiocitos

Después de que se formaron las monocapas de miocardiocitos de rata (MCR), se añadió a cada una de ellas 0.1 mM de ácido clofibrico disuelto en medio de cultivo CMRL 1066. Veinticuatro horas después se observó una vacuolización extensa del citoplasma y la mayoría de las células se desprendieron del sustrato y se redondearon. Obsérvese en la figura 8 que las células se destruyen casi completamente por efecto del ácido clofibrico.

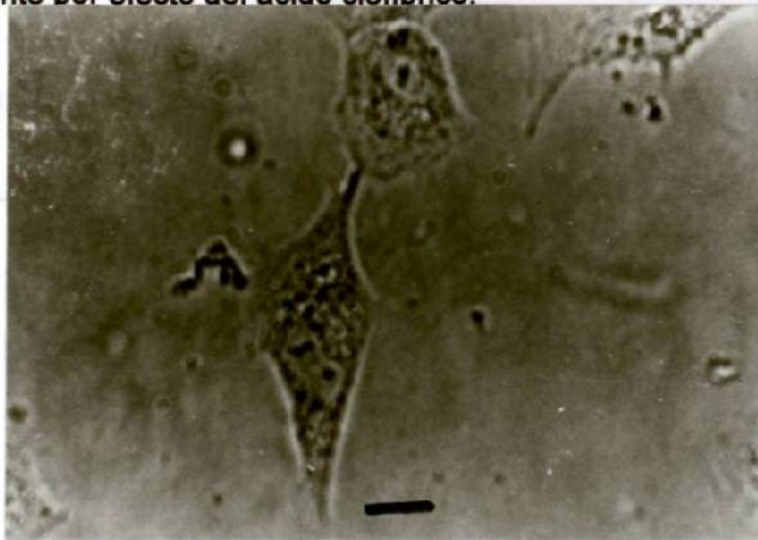


Figura 8. **Cultivo primario de miocardiocitos de rata tratado con ácido clofibrico 0.1 mM.** Los cultivos primarios de miocardiocitos fueron obtenidos como se describe en la página 30 de la sección de métodos. Se inocularon 2×10^6 células/ml en botellas de cultivo de plástico de 25 cm^2 conteniendo 3 ml de medio de cultivo CMRL 1066. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO_2 al 5 % hasta que se formó la monocapa (aproximadamente a los 10 días), después se agregó el ácido clofibrico 0.1 mM diluido en medio de cultivo fresco y se incubó por 24 h, luego se observaron con un microscopio invertido con un aumento de 400X, finalmente se fotografiaron con rollo Kodak ASA 200 (barra equivale a $10 \mu\text{m}$).

Efecto letal del ácido clofibrico sobre la viabilidad de cultivos primarios de miocardiocitos de rata.

La Tabla 3 muestra el porcentaje de células vivas y muertas de cultivos tratados con ácido clofibrico 0.1 mM. Se midió el porcentaje de citólisis de los miocardiocitos de rata después de la incubación con ácido clofibrico a dosis de 0.1mM por 24 h. Con esta dosis, se observó un 80.4 % de células vivas y 19.6 % de células muertas; en células sin tratamiento (SSB) la viabilidad fue del 98.8 % y 2% de células muertas; en las células tratadas con Tritón X-100 (control positivo) se obtuvo 1.17 % de viabilidad celular contra 98.83% de células muertas.

Con cultivos celulares no se utilizó el clofibrato debido a que las células no tienen las enzimas necesarias para metabolizar el clofibrato a ácido clofibrico, por lo que solo se trabajó con ácido clofibrico.

TABLA 3. Porcentaje de citólisis inducida por el ácido clofibrico, en cultivos primarios de miocardiocitos de rata. Mediante la técnica de MTT (pag. 32).

Tratamiento	% de células vivas	% de células muertas
SSB	98	2
Ácido clofibrico 0.1mM	80.4	19.6
Tritón -X100 (0.1%)	1.17	98.83

Disminución de la densidad de las bandas de vimentina y desmina por efecto del ácido

Análisis de proteínas insolubles en Tritón X-100 del citoesqueleto de los miocardiocitos sin tratamiento o de los tratados con ácido clofibríco.

La figura 10 muestra la banda de vimentina y desmina en un cultivo de miocardiocitos sin tratamiento y tratados con ácido clofibríco. Con este análisis

Las proteínas insolubles en Tritón X-100 obtenidas de cultivos primarios sin tratamiento o tratados con ácido clofibríco 0.1 mM se separaron en geles de PAA-SDS. Obsérvese que en los extractos de células tratadas con ácido clofibríco a concentraciones de 0.1mM los patrones electroforéticos revelaron una ligera disminución en la densidad de las bandas de 57 y 53 kDa (vimentina y desmina respectivamente) con respecto a los cultivos sin tratamiento. Este resultado es similar a lo observado con proteínas de extractos de corazón.

tratados con el ácido clofibríco.

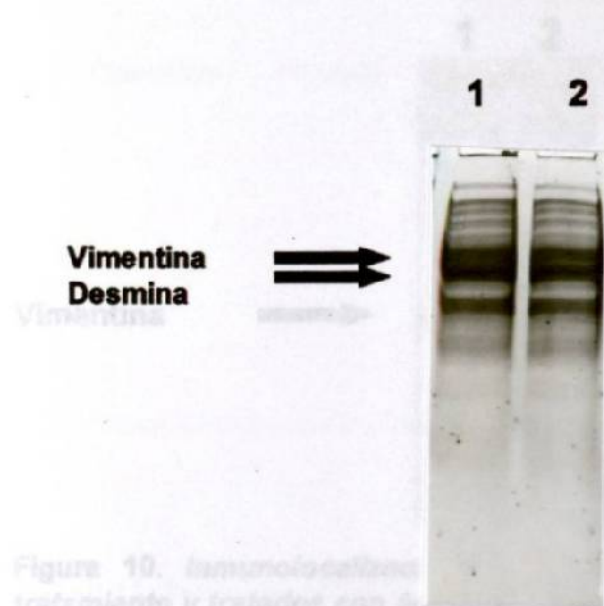


Figura 10. Inmunoblotaje de vimentina y desmina en cultivos de miocardiocitos sin tratamiento y tratados con ácido clofibríco. Las proteínas insolubles en Tritón X-100 al 1 % se disolvieron en buffer de muestras, se cargaron los geles de poliacrilamida al 10% con 25 µg de cada muestra y se realizó la electroforesis, se electrotransferó a membranas de

Figura 9. Análisis electroforético de las proteínas de cultivos primarios de miocardiocitos de rata sin tratamiento y tratados con ácido clofibríco 0.1 mM. A una caja de cultivo en confluencia se le agregó tripsina 0.1 % con la finalidad de despegar y disgregar las células. Las células se lavaron con PBS y las proteínas insolubles en Tritón X-100 al 1% se analizaron como se describió en el pie de la figura 1. El carril 1 corresponde a una muestra de cultivos de miocardiocitos de rata sin tratamiento. El carril 2 corresponde a una muestra tratada con ácido clofibríco. Las flechas indican las bandas correspondientes a la vimentina y desmina.

Disminución de la densidad de las bandas de vimentina por efecto del ácido clofibríco en cultivos de miocardiocitos de rata.

La figura 10 muestra la banda de inmunoprecipitación de la vimentina. Con este análisis se confirmó la disminución de la densidad de la banda de esta proteína. Las bandas corresponden a la vimentina presentes en cultivo de miocardiocitos de rata después de electrotransferirlas del gel de PAA-SDS a membranas de nitrocelulosa e incubarlas con los anticuerpos monoclonales marcados con fosfatasa alcalina. Obsérvese que la banda de las células tratadas con ácido clofibríco tiene una densidad ligeramente menor que la de las muestras sin tratamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente con extractos de corazón de animales tratados con el ácido clofibríco.

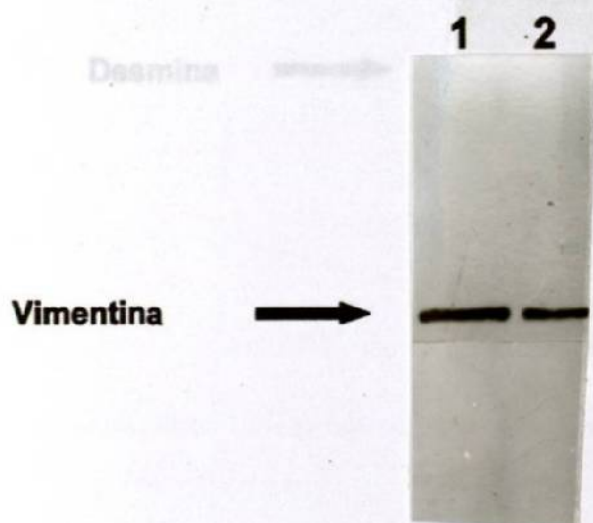


Figura 10. Inmunolocalización de vimentina en cultivos de miocardiocitos sin tratamiento y tratados con ácido clofibríco. Las proteínas insolubles en Tritón X-100 al 0.1 % se disolvieron en buffer de muestras, se cargaron los geles de poliacrilamida al 10% con 25 µg de cada muestra y se realizó la electroforesis, se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-vimentina marcados con fosfatasa alcalina, la reacción se reveló mediante un sustrato específico tal como se describe en la figura 3. El carril 1 corresponde a muestras sin tratamiento, mientras que el carril 2 corresponde a muestras tratadas con ácido clofibríco.

Disminución de la densidad de la banda de desmina por efecto del ácido clofibrico en cultivos de miocardiocitos de rata.

La figura 11 muestra la banda de inmunoprecipitación de la desmina que corresponden a un cultivo de células de corazón.

Obsérvese que la banda de desmina correspondiente a las células tratadas con ácido clofibrico tiene una densidad ligeramente menor que la de las muestras de cultivo sin tratamiento.

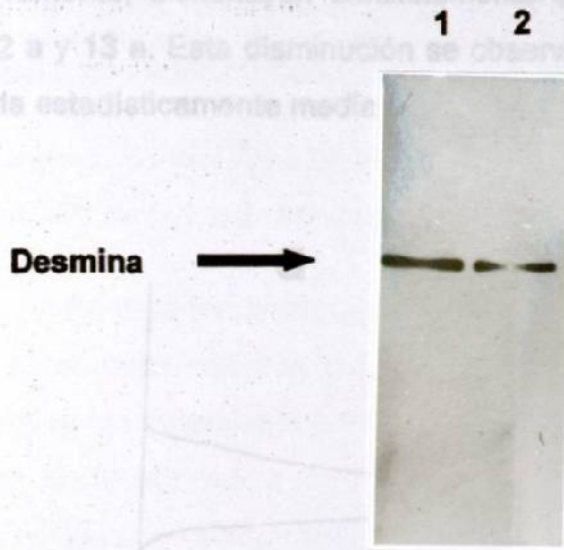


Figura 11. Inmunolocalización de desmina en cultivos de miocardiocitos sin tratamiento y tratados con ácido clofibrico. De igual forma que en los experimentos en la figura 10 se llevó a cabo la Inmunolocalización de las bandas correspondientes a la desmina utilizando anticuerpos monoclonales anti-desmina. El carril 1 corresponde a cultivo de células sin tratamiento, el carril 2, a cultivos de células tratadas con ácido clofibrico 0.1 mM.

Disminución de la densidad de vimentina y desmina de cultivos tratados con ácido clofibríco.

Con el objeto de determinar cuantitativamente los cambios observados en las bandas de vimentina y desmina en las células tratadas con ácido clofibríco 0.1 mM realizamos un análisis densitométrico de las bandas obtenidas por inmunoelectrotransferencia.

En las figuras 12 y 13 se muestran los densitogramas obtenidos. Las áreas bajo la curva en las figuras 12 b y 13 b que corresponden a la vimentina y desmina respectivamente, disminuyen sensiblemente con respecto al control sin tratamiento figura 12 a y 13 a. Esta disminución se observa claramente en la tabla 4 después de analizarla estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA).

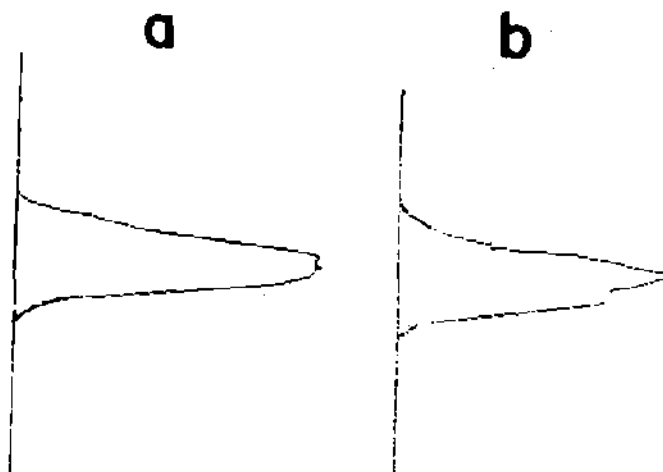


Figura 12. Densitograma correspondiente a la electroinmunotransferencia de vimentina. Este análisis se realizó a partir de los resultados que se muestran en la figura 10. Las membranas de nitrocelulosa que fueron previamente electrotransferidas a partir de los geles, fueron fotografiadas con una película fotográfica Kodak ASA 200 y a partir de los negativos se hicieron positivos y se obtuvieron filminas de 10 x 15 cm, se colocaron en el densitómetro modelo Beckman Appraise Junior y se leyó a una longitud de onda de 520 nm, a) corresponde muestras de cultivos sin tratamiento y b) corresponde a cultivos tratados con ácido clofibríco 0.1 mM.

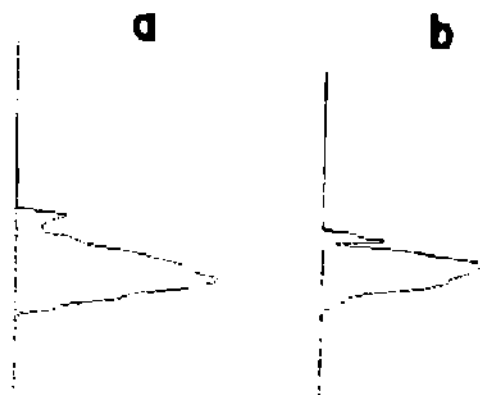


Figura 13. Densitograma correspondiente a la electroinmunotransferencia de desmina. El análisis se realizó a partir de los resultados de la figura 11 correspondientes a la inmunolocalización de la desmina. a) cultivo de células sin tratamiento y b) cultivo de células tratadas con ácido clofibrico 0.1 mM.

Disminución del área bajo la curva de vimentina y desmina de cultivos primarios de CMR tratados ácido clofibrico.

Se determinaron las áreas bajo la curva de los densitogramas de las figuras 12 y 13 correspondientes a la inmunolocalización de la vimentina y desmina, en los cultivos sin tratamiento o tratados con ácido clofibrico. Obsérvese que en las muestras que corresponden a cultivos tratados con ácido clofibrico hay una disminución estadísticamente significativa con respecto a los testigos no tratados.

Tabla 4. Disminución del contenido de vimentina y desmina en los cultivos de miocardiocitos tratados con ácido clofibrico a dosis de 0.1 mM.

Proteína	Área bajo la curva m ²	
	Sin Tratamiento	Ácido clofibrico 0.1 mM.
Vimentina	7.2±0.51	5.4±0.29*
Desmina	3.82±0.28	2.28±0.14*

*p<0.01 con respecto a los testigos no tratados
n=5

Este análisis se realizó en la misma forma que el descrito en la tabla 2 pero en lugar de utilizar los datos obtenidos de los densitogramas del corazón de animales, utilizamos los datos de los densitogramas obtenidos de los cultivos de miocardiocitos.

Cambios en la distribución de la vimentina y desmina en el citoesqueleto de miocardiocitos tratados con ácido clofibrico 0.1 mM.

Con el objeto de analizar los efectos del ácido clofibrico en la organización del citoesqueleto de los miocardiocitos, se marcaron las células con anticuerpos monoclonales anti-vimentina o anti-desmina marcados con fluoresceína como se describe en la página 34 de la sección de métodos. En las figuras 14 B y 15 B las mallas de las proteínas mencionadas se observan retraídas sobre la zona perinuclear. Obsérvese que las células modificaron sensiblemente su forma triangular típica, además, se retrajo considerablemente la malla típica del citoesqueleto que se nota extendida en células no tratadas.

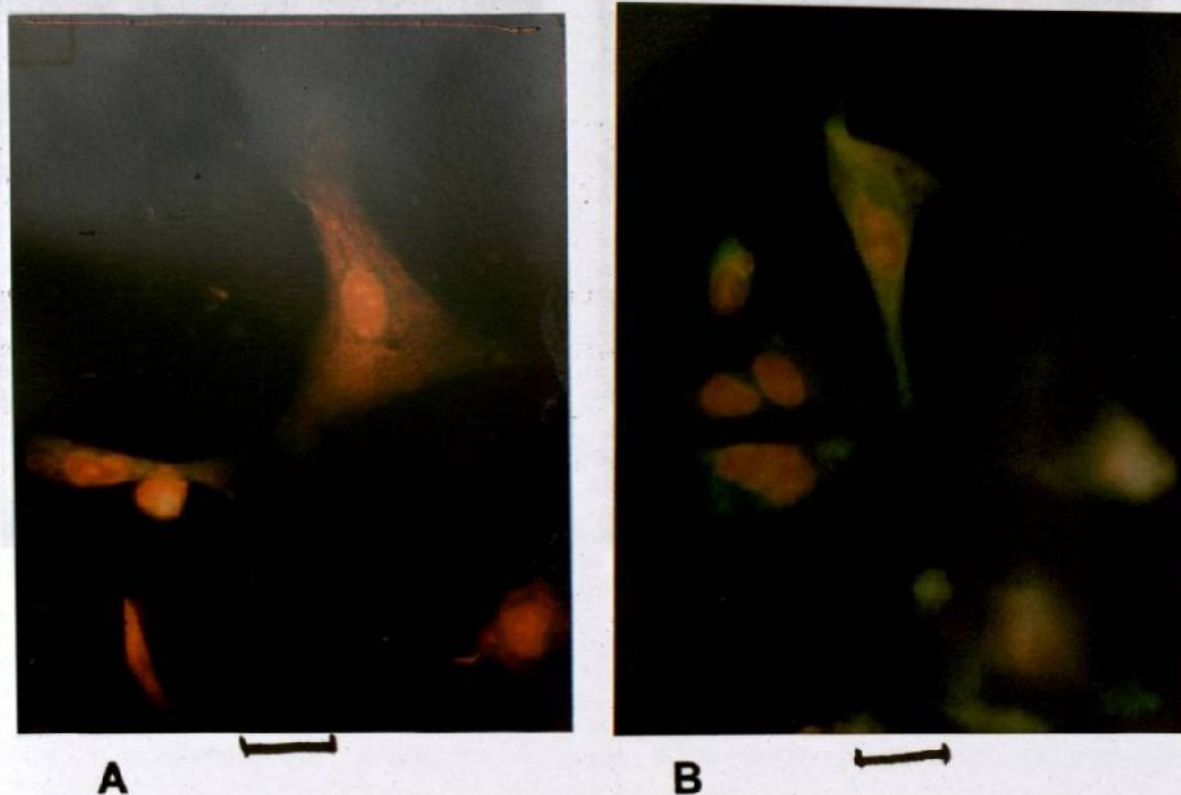


Figura 14. Modificación de la organización de la vimentina en el citoesqueleto de células tratadas con 0.1 mM de ácido clofibrico. Se muestran las células marcadas con anticuerpos fluorescentes. **A**, cultivo de células de corazón sin tratamiento y **B**, cultivo de células tratadas con ácido clofibrico a una concentración de 0.1 mM marcadas con Anti-desmina-fluoresceína. Las fotografías se tomaron utilizando un microscopio Axiophot ZEISS con filtros de triple banda DAPI, FITC y Rojo Texas con rollo Fuji Asa 100 con un tiempo de exposición de 30 segundos (barra equivale a 10 μ m).

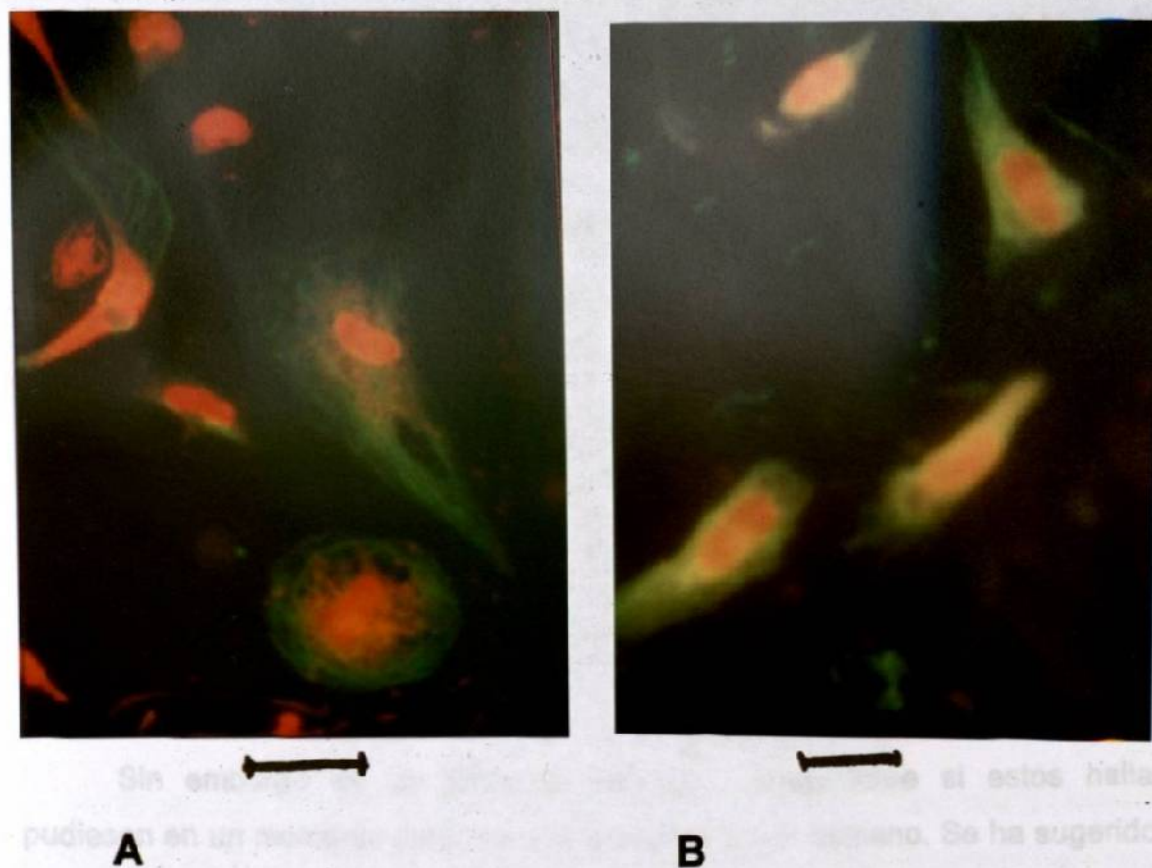


Figura 15. Modificación de la organización de la desmina en el citoesqueleto de células tratadas con 0.1 mM de ácido clofibrato. Se muestra las células marcadas con anticuerpos fluorescentes. **A**, cultivo de células de corazón sin tratamiento y **B**, tratadas con ácido clofibrato a una concentración de 0.1 mM marcadas con Anti vimentina-flouresceína. Las fotografías se tomaron como se describe en la figura 14 (barra equivale a 10 µm).

DISCUSION

En los últimos 20 años, los derivados de los ácidos fibricos (FAD) han sido las drogas de mayor uso para el tratamiento de las dislipidemias (Newman, 1996; Brown, 1987). El clofibrato y más recientemente el bezafibrato, el fenofibrato, y el gemfibrozil han sido usados para disminuir los niveles séricos de triglicéridos.

Aunque los derivados de ácidos fibricos han mostrado ser efectivos contra las hiperlipidemia, no se debe dejar a un lado la atención por sus efectos secundarios sobre el músculo esquelético y cardíaco, incluyendo mialgia y arritmia, atrial y ventricular, también se ha observado miolisis en algunos casos (M.B. Brown, 1987).

Los trabajos que se han realizado desde 1978 por un grupo de investigadores (Committee of principal Investigators, 1978) mencionan que con la utilización de derivados de ácidos fibricos en pacientes tratados durante 4 años, la incidencia de muertes por causas diferentes al infarto se incrementó significativamente hasta un 11 %. Además, mencionan que las principales causas de muerte son los problemas respiratorios, neoplasias malignas, entre otras. Estos resultados son semejantes a los reportes realizados por T.B. Newman, 1996 quienes sugieren que los derivados de ácidos fibricos deben considerarse como cancerígenos potenciales en roedores.

Sin embargo es de especial atención preguntarse si estos hallazgos pudiesen en un momento dado ser extrapolados al ser humano. Se ha sugerido que la hepatocarcinogenesis inducida por estas drogas está relacionada biológicamente con la presencia de productos activos, tales como el peróxido de hidrogeno producido por los peroxisomas, asociados con un marcado aumento de la actividad de oxidasas tales como la acyl CoA oxidasa de ácidos grasos, más que por el efecto directo de las drogas. De ahí que se considera posible la presencia de un receptor de drogas de este tipo asociado a un segundo mensajero. (T.B. Newman, 1996).

Esta hipótesis puede ser apoyada por el hecho de que se ha demostrado que los agentes hipolipidémicos, entre ellos el clofibrato, son inductores de peroxisomas (Watanabe T. y cols., 1989, J. K. Reddy, 1980).

Algunas alteraciones del corazón han estado relacionadas con la administración de ácidos fibricos (W.V. Brown, 1987). Es entonces posible que las alteraciones producidas por estas drogas que pueden causar la acumulación de filamentos intermediarios como la vimentina y desmina, u otras proteínas importantes en el anclaje como filamentos de actina y las bandas z, se relacionan con las alteraciones funcionales del corazón.

Los cultivos celulares son utilizados como modelos para estudiar la toxicidad inducida por drogas. Los indicadores de toxicidad que han sido desarrollados facilitan la evaluación de un daño celular determinado. Particularmente en células de corazón, los cultivos primarios ofrecen una ventaja sobre pruebas *in vivo* ya que los efectos de una droga pueden ser detectados antes de que el daño al corazón sea detectable. Además son eliminadas las complicaciones introducidas por influencias hemodinámicas. (Ramos y Acosta, 1990). Sin embargo, los estudios *in vivo* son modelos que siguen utilizándose ya que permiten evaluar el daño funcional que causa alguna droga sobre un órgano dado, tejido, célula, etc., así como sus efectos secundarios en el organismo íntegro.

El presente trabajo se realizó en dos etapas: en la primera nos propusimos a establecer en el laboratorio la técnica para aislar e identificar la vimentina y desmina del citoesqueleto de corazón de ratas tratadas con clofibrato o con su metabolito activo, el ácido clofibrico. La segunda etapa consistió en establecer la técnica para aislar, identificar y cultivar células de corazón de rata recién nacida. Con el fin de conocer como actúa la exposición a estas drogas sobre acumulación de los filamentos intermediarios de los miocardiocitos.

Nuestro modelo experimental de células cardíacas expuestas *in vitro* al ácido clofibrico y la administración crónica del clofibrato o ácido clofibrico a ratas *in vivo*

permitió determinar los efectos de estas drogas sobre las proteínas vimentina y desmina. Las técnicas utilizadas nos permitieron observar, identificar y cuantificar las proteínas características del citoesqueleto. Ya que el método utilizado permitió la separación de proteínas de células de corazón en dos grupos: proteínas solubles en Tritón-X-100 (proteínas citoplasmáticas) y proteínas insolubles en Tritón- X-100, las cuales incluyen las proteínas contractiles y del citoesqueleto.

En nuestro modelo *in vivo* pudimos observar alteraciones en la concentración de la vimentina y desmina (proteínas fundamentales en células cardíacas y musculares), en muestras obtenidas de animales tratados con clofibrato o con ácido clofibrico (metabolito activo).

Las proteínas del citoesqueleto insolubles en Tritón X-100 se analizaron en geles de poliacrilamida. Observamos que el ácido clofibrico causó una reducción en la densidad de las bandas de desmina y vimentina, mientras que el clofibrato no tuvo cambios aparentes. Estas observaciones fueron confirmadas mediante densitometría (Fig.2). Sin embargo, cuando se analizaron las bandas de desmina y vimentina mediante electroinmunotransferencia (Fig. 3 y 5) y densitometría (Fig. 4 y 6) se pudo comprobar una disminución significativa tanto en la vimentina como en la desmina, en animales tratados con clofibrato o ácido clofibrico.

Por otro lado, utilizando el sistema de cultivos primarios de células de corazón expuestas al ácido clofibrico, se logró aislar las proteínas del citoesqueleto insolubles en Tritón X-100 y pudo observarse una disminución significativa en la densidad de las bandas de vimentina y desmina. Estas observaciones fueron confirmadas mediante electroinmunotransferencia (Figuras 10 y 11) y densitometría (Fig. 12 y 13, Tabla 4).

Estos resultados son similares a los reportados por González y cols., (1991), solo que ellos utilizaron cultivos de miocardiocitos de pollo y el derivado de ácidos fibrícos que utilizaron fue el fenofibrato y observaron una disminución de vimentina y de desmina de un 13% y 4% respectivamente con respecto al control. Estos

mismos autores cuando realizaron el experimento con otro derivado de ácidos fibricos, como el gemfibrozil, observaron un incremento significativo en la concentración de la densidad de las bandas de vimentina y desmina de 12 y 19% respectivamente mientras que con el bezafibrato la desmina aumenta un 17% y la vimentina no sufrió cambios.

Nuestro análisis sobre la acumulación de los filamentos intermedarios (vimentina y desmina) muestra que en la fracción del citoesqueleto hay una disminución de la densidad de las bandas de vimentina y desmina de un 30 y 40% respectivamente (Tabla 4), resultados que concuerdan con los realizados por (González y cols., 1991) en miocardiocitos de pollo.

Según W. Lewis y cols., 1988, en términos generales la síntesis *in vitro* de proteínas contráctiles puede ser alterada tratando los miocardiocitos con ciertas drogas. Esto pudiera ocurrir de manera similar *in vivo*,. Los cambios encontrados en ambas proteínas sugieren una alteración directa en las proteínas o en la síntesis de proteína, al igual de lo que se ha descrito anteriormente en cambios observados en las proteínas del citoesqueleto de eritrocitos de rata tratadas con clofibrato. (Morales-Aguilera y Sampayo-Reyes, 1993).

Por otro lado Velez-C. y cols., (1993) en cultivos de miocardiocitos de pollo tratados con bezafibrato y fenofibrato observaron un incremento en las proteínas alfa-actina, troponina y tropomiosina, mientras que en cultivos expuestos al gemfibrozil no encontraron alterada ninguna proteína.

La observación microscópica de los cultivos tratados con dosis de 0.1 mM de ácido clofibrico demostró que a las 24 h las monocapas se desprenden del sustrato y las células tienden a redondearse (Fig. 8). Además cuando estas células se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-vimentina o anti-desmina acoplados a flouresceína, pudo observarse una diferencia en cuanto a la organización de la vimentina y de la desmina y a la forma normal de los miocardiocitos la cual es típicamente triangular. Bajo la acción de las drogas utilizadas en nuestro trabajo la

malla que conforman la vimentina y la desmina se observa compactada e irregular comparada con la de las células testigo a las que no se les administró ácido clofibrico (Fig.14 y 15). Los efectos del ácido clofibrico sobre el citoesqueleto podrían deberse a una alteración de la estructura de las proteínas y/o a una modificación sobre la síntesis de proteínas de las mismas.

Varias miopatías y cardiomiopatías han sido caracterizadas por la presencia alterada de filamentos intermediarios (D'Amati 1992). Los filamentos intermediarios son los que mantienen la estructura celular. La vimentina puede participar en el soporte del núcleo y mantenimiento de su posición dentro de la célula. La función de células musculares depende de su citoesqueleto el cual está muy organizado y se ha sugerido que la desmina actúa como integrador espacial de todos los componentes (Bruce Alberts, 1997). En consecuencia es posible que las alteraciones en la vimentina y desmina causadas por la administración de derivados de ácidos fibrícos estén relacionadas estrechamente con los efectos secundarios causadas por estos ácidos.

Este trabajo muestra que en nuestras condiciones experimentales los compuestos derivados de ácidos fibrícos producen una disminución en la cantidad de la vimentina y de desmina y una alteración de la estructura normal del citoesqueleto de miocardiocitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Considerando el papel que juegan los filamentos intermediarios como puntos de anclaje y que cualquier alteración en estas proteínas pudieran alterar la organización celular de los miocardiocitos, es posible que la disminución observada de estas proteínas durante la administración de estos fármacos sea en parte responsable de los efectos secundarios observados en pacientes.

CONCLUSIONES

El clofibrato o el ácido clofibrico producen alteraciones en el citoesqueleto de miocardiocitos en cultivo y de animales tratados.

En cultivos de células de miocardiocitos se altera la organización de la vimentina y desmina.

Nuestros hallazgos muestran que la concentración de la vimentina y la desmina en los miocardiocitos de rata disminuye significativamente después del tratamiento *in vitro* con el ácido clofibrico, de manera similar a lo que ocurre con la administración de clofibrato a animales íntegros.

Ya que los filamentos intermediarios actúan como puntos de anclaje y están activamente involucradas en la contracción muscular. Nuestros resultados sugieren que las alteraciones en el citoesqueleto pueden afectar la funcionalidad de las fibras cardíacas.

Se demuestra que la administración de este tipo de compuestos altera el citoesqueleto de los miocardiocitos de rata y dado que los experimentos *in vitro* demostraron que el ácido clofibrico induce dichos cambios, es posible que éste, sea el responsable de la toxicidad observada.

PERSPECTIVAS.

- 1. Investigar si existe correlación entre las alteraciones en el citoesqueleto de miocardiocitos observadas en este trabajo y las alteraciones funcionales del corazón.**
- 2. Investigar si las alteraciones estructurales y funcionales en el corazón de animales tratados crónicamente con clofibrato guardan relación con la acumulación de ácido clofibrico en tejidos blandos.**
- 3. Analizar mediante por microscopía confocal y electrónica las alteraciones que produce *in vitro* el ácido clofibrico sobre miocardiocitos.**
- 4. Establecer la relación cuantitativa entre dosis de ácido clofibrico y clofibrato, y los efectos sobre el citoesqueleto de miocardiocitos de rata.**
- 5. Ya que gran cantidad de efectos secundarios se han observado después de la utilización de derivados de ácidos fibricos, se considera importante el desarrollo de nuevos fármacos dislipidemiantes con menores efectos secundarios.**
- 6. Analizar con mayor detalle lo que está ocurriendo en las personas que consumen derivados de ácidos fibricos.**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

A. Lawrence Gould, Jacques E. Rossouw M.D.; Nancy C.; Santanello, M.D.; Joseph F. Heyse; Curt D.; Furberg M.D., (1995). *Circulation*. 91:8:2274-2283.

Adams Josephine C. and Watt Fiona M. (1988). An unusual strain of human keratinocytes which do not stratify or undergo terminal differentiation in culture. *J. Cell Biol.*, 107: 1927.

Affi A.K.; Hajj G.A.; Saad S.; Tekian A.; Bergman R.A.; Bahuth N.B.; Abourizk N. (1984). Clofibrate-Induced Myotoxicity in Rats. *European Neurology*. 23:182-197.

Bettoni G.; Loiodice F.; Tortorella V.; Conte-Camerino D.; Mambriani M.; Ferrannini E. and Bryant S.H. (1987). Stereospecificity of the chloride ion channel: The action of chiral clofibrates and analogues. *J. Med. Chem.* 30: 1267-1270.

Bilheimer D.W.; Grundy S.M.; Brown M.S.; Goldstein J.L. (1983). Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 80: 4124-4128.

Beaumont, J.L.; Carlson G.R.; Fejfar Z.; Fredrickson D.S. (1970). *Bulletin of the World Health Organization*. 43:291-908.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.

Brown. W.V. (1987). Potential use of fenofibrate and other fibric acid derivatives in clinic. *Am J. Med.* 83 Suppl. 5B. 85-89.

Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition, 1994, 796-803.

Committee of principal Investigators. (1978). A cooperative trial in the prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. *Br Heart J*, 40:1069-118.

Committee of principal Investigators. (1984). Report of. A cooperative trial in the prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. *The Lancet*. September 15: 600-604.

D' Amati. G., H.J. Kahan, J. Butany, and M.D. Silver. (1992). Altered distribution of desmin filaments in hypertrophic cardiomyopathy: an immunohistochemical study. *Toxicology*. 14:123-128.

D. Acosta and R. Chappell. (1975). *Cardiotoxicity of diazepam in cultured heart cells*. *Toxicology*, 8:311.

Díaz-Barreiro, Alcocer y Tovar Sosa Marco Antonio. (1990). *Tratamiento de las dislipidemias*. *Terapeutica*. 1(1): 1-12

Debus, E., Weber K; Osborn M. (1983). *Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein*. *EMBO J.*, 2: 2305-2312.

Donald B H., Tucker R.D. Azamoff D.L. (1969). *Long-Term effects of clofibrate (Atromid-S) on serum lipids in man*. *Circulation XXXIX*, 675-683.

Fredericson D.S., Levy R.I. Lees R.S. (1967). *Fat transport in lipoproteins an integrated approach to mechanisms and disorders*. *New England Journal of Medicine*. 276:33-34,94-105, 148-156, 215-224, 273-281.

Frick M.H., Elo O. Haapa K. Heinonen O.P. Heinsalmi P. (1987). *Helsinki heart study: primary trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia*. *New England Journal of Medicine*. 317:1237-1245.

González F.J. Linares A., Muros Ma, Velez C, Aranega A., Aranega A.E., Fernández-J.E., Alvarez L. (1991). *Influence of fibric acid derivates on intermediate filament proteins in myocardiocyte cultures*. *Life Sci*. 48(11): 1091-1099.

Goldstein J.L. Kita Y. Brown M.S. (1983). *Defective lipoprotein receptors and artherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia*. *New England Journal of Medicine*. 309:288-296.

Gray R.H. de la Iglesia F.A. (1984). *Quantitative microscopy comparasion peroxisome proliferation by the lipid- regulatin agent gemfibrozil in several species*. *Hepatology* 4:520-530.

Grundy S.M. Vega G.L. and Bilheimer D.W. (1985). *Influence of combined therapy with mevinolin and interruption of bile-acid reabsorption on low density in heterozygous familial hypercholesterolemia*. *Annals of Internal Medicine*. 103:339-243.

Gerald Karp (1987). *Biología Celular, Segunda Edición, Mc Graw Hill*. p. 699-704.

Illingworth D.R. Bacon S.P. Larsen K.K. (1988). *Long term experience with HMG CoA reductase inhibitors in the therapy of hypercholesterolemia*. *Atherosclerosis Reviews* 18:161-187.

J.K. Reddy and D.L. Azamoff. (1980). *Hypolipidaemic peroxisome proliferators form a novel class chemical carcinogens*. *Nature*. 283:397-398.

Kannel W.B. Castelli W.P. Gordon T. (1979). Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*. 90: 85-91.

Kocher O.; Skalli O.; Cerutti D.; Gabbiani F.; Gabbiani G. S.O. (1985). Cytoskeletal features of rat aortic cells during development. An electron microscopic, immunohistochemical, and biochemical study. *Circ-Res*. 56(6): 829-38.

Kwecinski H.; Lehmann Horn and Rudel Reinhardt. (1988). Drug-induced myotonia in human intercostal muscle. *Muscle and Nerve*. 11:576-581.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lalwani N.D.; Reddy M.K.; Qureshi S.A.; Sirtori C.R.; Abiko Y. (1983). Evaluation of selected hypolipidemic agents for the induction of peroxisomal enzymes and peroxisome proliferation in the rat liver. *Human Toxicology*. 2: 27-48.

Lawrence W. White. (1971). Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by clofibrate administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 178 (2):361-370.

Lewis W.; Perillo Nancy L.; González Basilio. (1988). Alfa-actin synthesis changes in cultured cardiac myocytes: Relationship to anthracycline. *J. Lab Clin Med*. 112:43-51.

Martin D.W.; Rodwell V.W. and Mayes P.A. (1982). *Bioquímica de Harper*. p. 199-222, 251.

Morales-Aguilera, A. and Sampayo-Reyes, A. (1993). Molecular changes in erythrocyte membranes induced by long-term administration of clofibrate. *European Journal of Pharmacology. Molecular Pharmacology Section*. 245:85-89.

Muros Ma, Velez C.; Aranega A. ; González-F.; Aranega A. E.; Fernández J.E.; Alvarez L. (1990). Modulation of cardiac contractility in myogenesis using antidesmin monoclonal antibody. *Rev-Esp-Cardiol*. May 43(5): 323.

Muros M.A. Velez C.; González F.J.; Velez C.; Aranega A.; Aranega A.E.; Alvarez L.; Fernández J.E. (1992). Changes in tropomyosin during primary culture of embryonic myocardiocytes. *J-Cardiovasc-Pharmacol.Cell. Biol. Int. Rep*. May; 16(5):451-464.

Muros M.A.; Aranega A.E.; Velez C.; Melguizo C.; Alvarez L.; Aranega A. (1994). Modulation of contractile proteins in embryonic and fetal chick cardiac cells by phorbol ester, gamma-interferon, 5-azacytidine and diacylglycerols. *Life-Sci*. 54(3): 171-83.

- M. Chevais. (1990). Bases Pharmacologiques de l'utilisation des effets hypolipémiants du clofibrate. *Thérapie*. 35:5-22.
- Nag A.C.; Krehel W.; Cheng M. S.O. (1986). Distributions of vimentin and desmin filaments in embryonic cardiac muscle cells in culture. *Cytobios*. 45(182-183): 195-209.
- Newman T.B. (1996). Carcinogenicity of lipid Lowering Drugs. *JAMA*. Vol.275 No.1.
- Nikkari S.T.; Koistinaho J.; Jaakkola O. A.D. (1990). Changes in the composition of cytoskeletal and cytocontractile proteins of rat aortic smooth muscle cells during aging. *Differentiation*. Sep. 44(3): 216-21.
- Oliver M.F.; Heady J.A.; Morris J.N.; and Cooper M.J. (1978) A Co-operative trial in the primary prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. *Br. Heart J*. 40:1069-1118.
- Olson A. G. and Molgard J. (1988). The future of pharmacological therapy for risk factor reduction. *Drugs* 36 (suppl. 3), 115-120.
- Palmberg L. and Thyberg J. S.O. (1986). Uterine smooth muscle cells in primary culture. Alterations in fine structure, cytoskeletal organization and growth characteristics. *Cell-Tissue-Res*. 246(2): 253-62.
- Platt D.S. and Thorp J.M. (1966). Changes in the weight and composition of liver in the rat, dog and monkey treated with ethyl chlorophenoxyisobutirate. *Biochemical Pharmacology*. 15:915-925.
- Quinlan R.A.; Hatzfeld M.; Franke W.W.; Lustig A.; Schulthess T. Engel J. (1986). Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. *J.Mol.Biol*. Nov 20; 192(2): 337-49.
- Sampayo-Reyes, A. and Morales-Aguilera A. (1994). Changes in rat erythrocytes shape and osmotic resistance induced by clofibrate. *Archives of Medical Research*. Vol 24 (1).
- Stahlberg D., Angelin Bo.; Einarsson Kurt. (1989). Effects of treatment with clofibrate, bezafibrate, and ciprofibrate on the metabolism of cholesterol in rat liver microsomes. *Journal of Lipid Research*. 30:953-958.
- Seifert J. and H. Mostecká. (1987). Effect of clofibrate on DNA synthesis in rat liver and kidney. *Toxicology*. 60:131-132.
- Teravainen Heikki.; Andreo Larsen and Matii Hillbom. (1977). Clofibrate-Induced Myopathy in the rat. *Acta Neuropathologica*. 39, 135-138.

- Thompson G.R. (1988). Normal and Pathological lipoprotein metabolism. *Drugs*. 36 Sup.3:55-54.
- Tarloff, J.B. Goldstein, R.S. (1994). *In vitro*. Assessment of Nephrotoxicity. En :*In vitro Toxicology*. Editado por Shayne C. Gad. Raven Press, Ltd., New York. 149-193.
- Thorp J.M. and Waring.W.S (1962). Modification and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature*. 194:948-949.
- Todd P.A. and Ward A. (1988). Gemfibrozil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs*. 36: 314-339.
- Velez C.; Gonzáles F.J.; Muros Ma.; Velez C.; Aranega A.; Aranega A.E.; Alvarez L.; Prados Salazar. (1992). Quantification and distribution of troponin-T in cultures of chick embryo myocardiocytes. *Acta Anat-Basel*. 145(3): 269-76.
- Velez C.; Aranega A.E.; Muros M.A.; Melguizo C.; González A.R.; Alvarez L.; Aranega A. (1993). Changes in subcellular accumulation of contractile proteins in myocardiocyte cultures: effects of fibric acid derivatives. *J-Cardiovasc-Pharmacol*. Jan; 21(1): 40-6.
- Yi-Han Chang; Pinson R.; Malone M.H. (1967). Displacement of L-thyroxine from its binding proteins in human dog and rat plasma by alfa-p-chlorophenoxyisobutyric acid. *Biochemical Pharmacology*. 16:2053-2055.
- Watanabe Takafumi; Shuichi Horie; Junji Yamada; Masayuki Isaji; Toshiaki Nishigaki; Jun Naito and Tetsuya Suga. (1989). Species differences in the effects of bezafibrate, a hypolipidemic agent, on hepatic peroxisome-associated enzymes. *Biochemical Pharmacology*, vo. 38.No.2 pp.367-371.
- Wilkening, J., Wolpert F., Schwandt P. (1978). Glycolytic metabolites and adenosine triphosphate in skeletal and cardiac muscle of rats after clofibrate feeding. *Biochem. Pharmacol*. 27: 244-245.
- Witztum, Joseph L. (1997). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen 3. Ed. McGraw Hill Interamericana. pp. 637-962.

