

Cinética de la Radioactividad total (RT) tras la Administración Oral y Endovenosa de Dosis Únicas de Ácido ³H-octacosanoico a Ratas

Roberto MENÉNDEZ *, Rosa MAS, Yohani PÉREZ, Rosa Ma. GONZÁLEZ & Sonia JIMÉNEZ

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Apto. Postal 6412. La Habana, Cuba.

RESUMEN. El D003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos de muy alto peso molecular aislada y purificada de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), cuyo componente principal es el ácido octacosanoico. También están presentes los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico. Asumiendo la similitud estructural de los componentes, así como que el componente mayoritario de la mezcla es el ácido octacosanoico, los estudios farmacocinéticos del D003 se realizaron siguiendo la farmacocinética del ácido ³H-octacosanoico. Tanto tras la administración oral como endovenosa (iv) del ³H-octacosanoico (40 mg/kg), la caída de la radioactividad total (RT) es muy lenta, observándose valores elevados del $t_{1/2}$ de eliminación. Tras la absorción la RT se distribuye notablemente en diferentes tejidos, aunque el hígado es el órgano donde más se localiza a lo largo de todo el estudio. Durante las primeras 6 h la RT se distribuye preferentemente en hígado, estómago e intestino delgado, donde las concentraciones son superiores a las del plasma. Las concentraciones de RT en tejido adiposo al inicio son bajas, pero posteriormente se incrementan gradualmente. Por la vía oral, la vía excreción de la RT es principalmente por heces (63,3%) aunque por la orina se excreta un 24,7% de la dosis administrada. Por ambas vías, la eliminación de la RT es lenta, lo cual es congruente con la marcada distribución y retención tisular de la RT. La absorción del compuesto marcado a través del tracto gastrointestinal es rápida, a juzgar por los niveles de RT plasmática a los 15 min y el máximo de concentración observado a los 30 min. La biodistribución de RT sugiere la absorción a nivel de estómago e intestino delgado. La cantidad absorbida, estimada de acuerdo al cociente de excreción renal tras la administración oral y endovenosa del compuesto marcado, fue de un 61,15%. Durante las primeras h posteriores a la administración oral, la mayor parte de la RT presente en hígado y plasma esta asociada a la fracción lipídica, lo cual resulta congruente con la naturaleza del compuesto administrado. Sin embargo, la disminución del porcentaje de RT asociada al extracto lipídico respecto a la total del tejido hepático en el tiempo, sugiere la posible degradación paulatina del ácido. La aparición de radioactividad en fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol del tejido hepático y del plasma indica la posible esterificación del ácido octacosanoico o de sus metabolitos a estos compuestos lipídicos. Un porcentaje alto de la RT plasmática se transporta en las lipoproteínas, preferentemente en la fracción donde migran las VLDLs, lo cual es congruente con el incremento paulatino de la RT en tejido adiposo.

SUMMARY. "Kinetics of Total Radioactivity (TR) after the Oral and Endovenouse Administration of Single Doses of ³H-octacosanoic Acid in Rats". D003 is a mixture of higher aliphatic primary alcohols purified from sugar cane wax in which octacosanoic acid is its main component, followed by triacontanoic, dotriacontanoic and tetracosanoic acid. Bearing in mind not only this fact, but also considering the very close structural relationships among the components of the mixture, we follow ³H-octacosanoic pharmacokinetic as relevant surrogate for D003 pharmacokinetics. After both, oral and endovenous (iv) route, plasma elimination of total radioactivity (TR) slowly decline, as judge by the elimination half-life. After absorption, TR was extensively distributed in the different tissues, but the highest amount of radioactivity was present in liver throughout the study. Within the first 6 h, radioactivity was also preferably located in stomach and small bowel. Radioactivity found in plasma was lower than those found in these organs. At the beginning of the experiment, TR found in adipose tissue was low, however, these values increased thereafter. After oral administration, TR was primarily excreted by feces (63.3%), although urine excretion accounted 24.7% of the administered dose. The excretion profile after both routes indicated a rather slow elimination of TR, which agrees with the extensive distribution and retention of radioactivity in tissues. The maximum concentration of radioactivity in plasma occurred 30 min after oral dosing. This fact together with the level of radioactivity attained in plasma within the first 15 min, indicates a rapid absorption of the labeled compound. Tissue distribution suggest that absorption might occur in stomach and small bowel. Absorption accounted for 61.15%. Within the first hours after oral dosing the total radioactivity in plasma and liver was almost completely extracted by chloroform:methanol. However, the radioactivity of lipid extract decreased thereafter, suggesting octacosanoic acid degradation. Within the first 2 h plasma and hepatic TR was located in phospholipids, cholesterol esters and triglycerides, which suggest that octacosanoic acid and probably octacosanoic metabolites have been esterified. At two hours it was found that part of the plasma radioactivity was located in lipoprotein fractions mainly in VLDLs. Thus, the increase of TR in adipose tissue, suggest that part of it was stored in the fat pool of the adipose tissue.

PALABRAS CLAVE: Ácido octacosanoico, D003, Derivado de la caña de azúcar, Farmacocinética.

KEY WORDS: D003, Octacosanoic acid, Pharmacokinetics, Sugar cane derivative.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: E-mail: cpn.bioquímica@enic.edu.cu

INTRODUCCIÓN

El D003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos de muy alto peso molecular aislada y purificada de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Su componente principal es el ácido octacosanoico, encontrándose también presentes los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico. En esta sustancia aparecen también los ácidos hexacosanoico, nonacosanoico, hentriacontanoico, tritriacontanoico, pentatriacontanoico y hexacotriacontanoico como componentes menores ¹.

Estudios previos han demostrado que el D003 presenta efectos hipocolesteromizantes en modelos experimentales ² y humanos ^{3,4}, los cuales se producen al menos en parte, a través de la inhibición de biosíntesis de colesterol y el incremento del aclaramiento plasmático de la LDL ². También, se ha observado que el D-003 inhibe la agregación plaquetaria ^{5,6} y la peroxidación lipídica de fracciones de lipoproteínas plasmáticas ^{3,8}, tanto en modelos experimentales como en humanos.

Teniendo en cuenta que los componentes de la mezcla presentan características estructurales muy similares, es lógico suponer que su comportamiento farmacocinético sea similar. Asumiendo este hecho, así como que el componente mayoritario de la mezcla es el ácido octacosanoico, compuesto que reproduce algunos de los efectos farmacológicos del D-003, los estudios farmacocinéticos del D003 se realizaron utilizando como surrogado la farmacocinética del ácido octacosanoico.

En consecuencia, los objetivos del presente estudio consistieron en estudiar la farmacocinética de la radiactividad total (RT) derivada de la administración oral y endovenosa de dosis únicas de ³H-octacosanoico a ratas. Con tal objetivo, se investigaron los niveles plasmáticos, la distribución tisular y la excreción de la RT tras la administración oral e intravenosa del compuesto marcado. Adicionalmente, se investigó el metabolismo del ácido octacosanoico tras la administración oral del compuesto marcado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos (230-250g) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba), las cuales fueron adaptadas durante 15 días a las condiciones del laboratorio (temperatura 25 ± 20 °C, humedad relativa 50-60%, ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y distribuidos aleatoriamente de acuerdo a sus pesos

corporales en 5 animales por tiempo experimental de tal manera que cada animal aportara todas las muestras previstas en los tiempos post-dosis. Antes del experimento y durante su realización, los animales se alimentaron con pienso estándar para ratas suministrado por el CENPALAB y recibieron agua ad libitum. En las experiencias de administración oral los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 h previo a la administración del compuesto marcado. Todo el estudio se realizó conforme las orientaciones éticas del manejo de animales y las recomendaciones nacionales para las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Preparación de la dosificación

El ³H-octacosanoico que se utilizó en el presente estudio se marcó isotópicamente en los laboratorios del Centro de Isótopos (La Habana, Cuba). Para el marcaje se empleó una modificación del método de intercambio isotópico catalítico ⁹ descrito por Evans ¹⁰. La pureza química y radioquímica del compuesto marcado utilizado fue del 95% y del 98%, respectivamente. El chequeo de estos parámetros se realizó por Cromatografía de Capa Fina (CCF) en placas de gel de sílice, utilizando como solvente de corrida cloroformo: ácido acético (98:2, v/v)

Previo a la administración, el ³H-octacosanoico fue mezclado con D003, asegurando la administración de una dosis equivalente a 40 mg de D003/kg de peso corporal para ambas vías de administración. Para ello se preparó inicialmente la suspensión de D003 por el método convencional y posteriormente, la mezcla isotópica. Con este objetivo, se tomó una alícuota del compuesto marcado que se correspondió en volumen a la radioactividad total /ml reportada por el fabricante. Esta muestra fue llevada a sequedad mediante ligero calentamiento y la aplicación de una corriente de N₂. Posteriormente, se adicionó la suspensión de D003 previamente preparada y la mezcla fue agitada vigorosamente con Vortex y aplicación de ultrasonido. Ulteriormente, la mezcla isotópica fue dejada en reposo por espacio de 30 min y se chequeó la homogeneidad radioactiva mediante centelleo líquido.

Colección de las muestras de plasma

En el estudio de administración oral, los animales fueron administrados por entubación gástrica (4 ml/kg). Tras la administración del compuesto marcado, los animales fueron anestesiados con éter y se extrajeron muestras de sangre de la vena cava. Las muestras fueron tomadas a 3 animales sin administrar (control sin radiactividad) y transcurridos 15, 30 min y 1, 2, 6, 10, 24,

48, 72, 96, 120 y 144 h después de la administración del compuesto marcado. En el estudio de administración iv, la mezcla isotópica fue administrada a través de la vena del pene (2 µl/g de peso). Tras la administración, los animales fueron anestesiados con éter y se extrajeron muestras de sangre a 3 animales sin administrar y transcurridos 5, 30 min y 1, 2, 6, 10, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h después de la administración del compuesto marcado. La sangre fue colectada en tubos previamente heparinizados (50U/mL de sangre) y fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 min para obtener el plasma. Las muestras de plasma fueron almacenadas en congelación (-20 °C) hasta su utilización.

Colección de las muestras de órgano en el estudio de administración oral

Luego de desangrados, los órganos seleccionados para el estudio fueron disecados rápidamente y se tomaron dos alícuotas de aproximadamente 100 mg de cada órgano, las cuales fueron lavadas tres veces con solución salina fisiológica con el fin de eliminar los restos de sangre. Las muestras fueron secadas con papel de filtro y pesadas en balanza analítica. Posteriormente, fueron colocadas en viales de centelleo y almacenadas a -20 °C hasta su utilización. Se tomaron muestras de hígado, pulmón (derecho), bazo, cerebro, riñón (derecho), tejido adiposo (subcutáneo), músculo (pata derecha), estómago, intestino grueso (porción distal) y delgado (porción proximal), glándulas adrenales, ojos, corazón y testículos (derecho).

Estudios de excreción

Para cuantificar la excreción de la RT tras la administración oral e intravenosa (iv) del compuesto marcado se utilizaron los animales del último tiempo experimental. Una vez administrados, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales, en las cuales se les permitió el libre acceso al agua y al alimento. Se colectaron cuantitativamente las heces y la orina a intervalos de 24 h. Las muestras de orina, una vez colectadas, fueron llevadas a un volumen uniforme añadiéndoles agua destilada.

Procesamiento de las muestras para cuantificar la RT

Plasma y orina

Se tomaron alícuotas de 100 µL de cada muestra y se transfirieron directamente a viales de centelleo. Posteriormente, se añadieron 200 µL de solubilizador de tejido (Scinttran). La mezcla bien tapada fue agitada vigorosamente y posteriormente colocada en baño de María a 40 °C durante 20 min.

Órganos y tejidos

Las alícuotas de los órganos y tejidos almacenadas en los viales de centelleo y previamente pesadas fueron homogenizadas con un homogenizador de cuchilla Ultraturax añadiéndoles 1 mL de agua destilada. Los homogenatos obtenidos fueron solubilizados mediante la adición de 500 µL de solubilizador de tejidos y agitación constante en baño de María a 40 °C durante aproximadamente 20 h o hasta lograr la completa solubilización del tejido.

Heces

Las heces colectadas durante los diferentes intervalos de tiempo, fueron llevadas a sequedad colocándolas en estufa a 60 °C durante 12 h. Posteriormente, fueron pesadas en balanza analítica y trituradas con la ayuda de un mortero. Luego de garantizar una correcta homogenización del polvo, se transfirieron 10 mg de cada muestra a viales de centelleo, en los cuales se solubilizaron de forma análoga que las muestras anteriores, pero añadiéndoles previamente 200 µL de agua destilada y 1 mL de solubilizador de tejidos.

En todos los casos y siempre que fue requerido, las muestras fueron decoloradas añadiéndoles H₂O₂ al 30% y sometíendolas a ligero calentamiento. Antes de la lectura de la RT, las muestras fueron acidificadas mediante la adición de 30 µL de ácido acético y dejadas en reposo y protegidas de la luz durante como mínimo 24 h. La lectura de radioactividad se realizó añadiendo 10 mL de líquido de centelleo.

Medición de la radioactividad

Las lecturas de la RT se realizaron en un contador de centelleo Rackbeta, modelo 1219 (LKB). La corrección de "quenching" fue realizada automáticamente por el equipo por el método del estándar externo. Los valores de RT de cada muestra (dpm/min) fueron expresados en µgEq del compuesto marcado/gramo de tejido o mL de fluido biológico. Para este cálculo se tomó en consideración primeramente la homogeneidad de la mezcla isotópica administrada, aspecto que fue verificado antes de la administración utilizando suspensiones frescas, preparadas 4 h como máximo antes del inicio del experimento. En segundo lugar, se consideró despreciable la contribución en masa del ácido octacosanoico marcado a la masa total de octacosanoico de acuerdo a la alta actividad específica del compuesto marcado (1mCi/mg) añadido a la mezcla isotópica. Por ello, el cálculo final de la actividad específica del octacosanoico fue realizado tomando en cuenta la radiactividad añadi-

da y el % de ácido octacosanoico que posee el D003 utilizado en la preparación de la suspensión.

Procesamiento de los datos

Las áreas bajo de curva (AUC) y los $t_{1/2}$ en la fase terminal del curso temporal de la RAT en plasma fueron calculados por el programa de

cómputo Win Nonlin™ Profesional (versión 2.1), utilizando un modelo de distribución no compartimental.

La cantidad absorbida fue calculada a partir de la excreción urinaria de la RAT tras la administración oral e iv de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Dosis absorbida (\%)} = \frac{\text{RAT excretada tras administración oral}}{\text{RAT excretada tras administración iv}} \times 100$$

La excreción fue expresada como el porcentaje de RT excretada con respecto a la dosis radiactiva total administrada a cada animal.

Estudios sobre el metabolismo del ácido octacosanoico

Para esta determinación se utilizaron muestras de tejido hepático obtenidas a las 2, 10 y 24 h posteriores a la administración del compuesto marcado. Para cumplimentar este objetivo, un gramo de tejido fue homogenizado en solución salina fisiológica (1:9, p/v) y se cuantificó la RT presente en 200 µl de homogenizado, siguiendo el procedimiento descrito para las muestras de tejido. Para la determinación de la RT asociada a los lípidos, se tomaron 200 µl del mismo homogenizado, a los cuales se añadieron 6 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v). Tras agitación vigorosa en Vortex (15 min) y centrifugación a 4000 rpm durante 20 min, se extrajo cuantitativamente la capa orgánica mediante aspiración con un capilar de vidrio. Posteriormente, el extracto lipídico fue llevado a sequedad en atmósfera de N₂, y tras disolverlo nuevamente en 200 µl de cloroformo, el contenido total del tubo de ensayo fue transferido a un vial se centelleo, lo cual se garantizó por sucesivos lavados con cloroformo. La RT del extracto lipídico fue expresada como % relativo a la obtenida en el homogenato. Esta determinación fue realizada también en plasma. Para ello, se utilizaron las muestras de plasma obtenidas a las 2 h posteriores a la administración del compuesto marcado y se utilizaron 200 µl de plasma.

Con el objetivo de investigar la naturaleza de los lípidos a los cuales se encontraba asociada la radioactividad encontrada, los extractos lipídicos fueron aplicados a placas de gel de sílice. El solvente de corrida utilizado fue una mezcla de éter de petróleo: éter etílico: ácido acético (90:10:1). Al finalizar la corrida, el cromatograma fue revelado con vapores de yodo. Las manchas correspondientes a los fosfolípidos, triglicéridos, ésteres de colesterol y ácidos grasos fueron identificadas por la corrida simultánea de

patrones y posteriormente transferidas a viales de centelleo. La radioactividad asociada a cada mancha fue expresada en % relativo a la radioactividad determinada en el extracto lipídico total.

Con el objetivo de continuar investigando la distribución de la RT en plasma a las 2 h de la administración del compuesto marcado, las VLDL, LDL y HDL fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de KBr y centrifugadas a 200 000 x g durante 20 h a 10 °C en una ultracentrífuga Beckman modelo L7, según la técnica desarrollada por Terpstra *et al.*¹¹. Las fracciones correspondientes a las partículas de VLDL, LDL, HDL y la fracción de plasma que no migra tras el proceso de ultracentrifugación fueron colectadas cuantitativamente y se transfirieron a viales de centelleo con el objetivo de determinar la radioactividad. Los valores de RT se expresan en % relativo a la radioactividad presente en el plasma total. Con el fin de determinar a qué especies lipídicas se encontraba asociada la radioactividad transportada en el conjunto de lipoproteínas y en la porción residual de plasma, los extractos lipídicos fueron aplicados a placas de gel de sílice y fueron identificados utilizando una mezcla de solventes similar. Los datos de estas experiencias se expresaron como % de radioactividad presente en cada mancha lipídica relativo a la RT cuantificada en el extracto lipídico de cada tipo de muestra y representan los valores de tres determinaciones realizadas en tres muestras provenientes de tres animales diferentes.

RESULTADOS

Estudio de los niveles plasmáticos de RT

Las Figs. 1 y 2 muestran el curso temporal de la RT plasmática (expresada en µgEq/ml de fluido) tras la administración oral e iv del compuesto marcado. La máxima concentración plasmática tras la administración oral se alcanza a los 30 min. El valor medio encontrado para ese punto fue de $54,99 \pm 6.10$ µgEq de ácido octacosanoi-

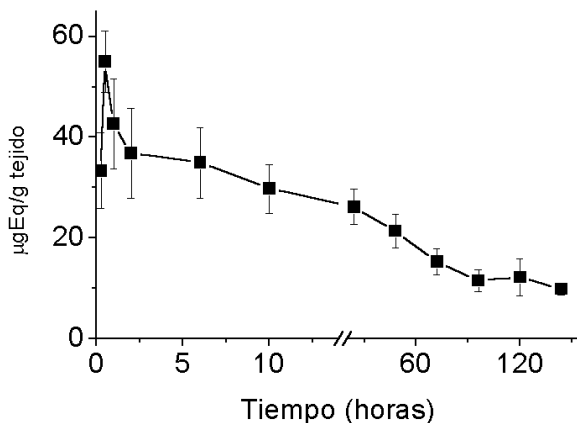


Figura 1. Curso temporal de los niveles de RT tras la administración oral de ^3H -octacosanoico a ratas. Los valores de la curva representan el valor medio \pm desviación estándar de 5 animales en cada tiempo experimental.

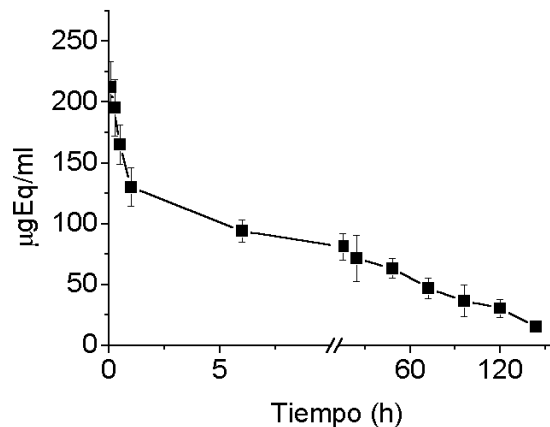


Figura 2. Curso temporal de los niveles de RT en plasma tras la administración iv de ^3H -octacosanoico. Los valores de la curva representan el valor medio \pm desviación estándar de 5 animales en cada tiempo experimental.

co/ml de plasma. Tras alcanzar estos niveles, a las 24 y a las 72 h aún se cuantifican valores apreciables de RT ($26,17 \pm 3,40$) y ($15,27 \pm 2,59$), respectivamente. El $t_{1/2}$ en la fase de eliminación fue de 70,15 h. Los valores de RT se caracterizan por una gran variabilidad interanimal. Así por ejemplo, en el momento en que se alcanza la máxima concentración plasmática (30 min), los valores individuales de RT fluctúan entre un 48,80 y un 68,13.

La primera muestra tomada a los 5 min de la administración iv del compuesto marcado presentó elevados niveles de RT ($212,56 \pm 21,10$). Posteriormente se observa una rápida caída de la RT de modo que el valor promedio de RT a la hora es de $130,22 \pm 15,76$, mientras que a las 6 h es de $94,32 \pm 9,00$. El $t_{1/2}$ de eliminación por esta vía resultó de 54,02 h.

Distribución en tejidos

La Tabla 1 muestra los valores de la distribución de RT en los órganos y tejidos en cada tiempo experimental. Los resultados del estudio de biodistribución muestran que tras la absorción del compuesto marcado, desde los primeros min la RT se distribuye notablemente en diferentes tejidos. Sin embargo, se observan diferencias que indican que la RT no se distribuye de manera uniforme en todas las muestras estudiadas. Teniendo en cuenta el número de órganos y tejidos investigados y que el análisis visual de las curvas temporales sólo permitiría realizar una comparación cualitativa no exenta de errores, decidimos analizar los valores acumulados de AUC de cada perfil con el objetivo de hacer una comparación cuantitativa de la distri-

bución de la RT durante toda la duración del experimento. Para ello, comparamos los valores de AUC acumulados hasta las 2 h de haberse administrado el compuesto marcado y a los intervalos 0-6, 0-24 y 0-144 h, con el objetivo de mostrar el curso temporal del AUC acumulada durante estos intervalos de tiempo.

La Fig. 3 muestra en orden decreciente las AUC acumuladas de los tejidos y del plasma en cada intervalo de tiempo seleccionado. Como puede apreciarse, desde las primeras 2 h hasta el final de la experiencia (144 h) el hígado es el órgano de mayor acumulación y retención de RT. Los restantes órganos y tejidos, sin embargo, varían su posición relativa, como comentaremos a continuación. En el primer intervalo de tiempo (0-2 h, Fig. 3), después del hígado, los mayores valores de AUC se presentan en estómago, intestino delgado (porción proximal) y plasma. Los valores elevados de AUC en el estómago son consistentes con que a los 15 min (primera toma de muestra) se observan elevados niveles de RT ($93,24 \mu\text{gEq/g}$, Tabla 1). En el intestino delgado, sin embargo, los iniciales de RT no son altos ($35,72 \mu\text{gEq/g}$, Tabla 1), si bien a la hora se alcanza un máximo de concentración ($67,57 \mu\text{gEq/g}$, Tabla 1) que puede influir en el elevado valor relativo de AUC acumulada hasta las 2 h.

En el gráfico donde se presentan los valores de AUC acumulados hasta las 6 h (intervalo 0-6 h, Fig. 3), puede apreciarse que el intestino delgado pasa a ocupar la segunda posición. Este hecho está dado porque en el estómago se produce una caída de la RT relativamente rápida, ya que a la hora los niveles han descendido de $93,24 \mu\text{gEq/g}$ a $63,10 \mu\text{gEq/g}$, llegando a $18,28$

Tejido	Tiempo de muestreo (h)					
	0.25	0.5	1	2	6	10
Hígado	51,89 ± 10,81	61,52 ± 11,16	90,28 ± 12,72	84,11 ± 4,35	84,81 ± 4,12	80,83 ± 6,37
Estómago	93,24 ± 3,72	83,46 ± 4,00	63,10 ± 4,83	49,00 ± 2,30	31,07 ± 5,16	22,65 ± 3,87
Intestino Delgado	35,72 ± 6,54	57,04 ± 6,03	67,57 ± 3,25	59,04 ± 6,75	48,70 ± 2,45	40,51 ± 2,01
Intestino Grueso	13,66 ± 5,23	17,22 ± 4,33	20,96 ± 7,23	31,80 ± 6,33	29,88 ± 1,45	23,97 ± 3,02
Corazón	9,19 ± 1,63	18,71 ± 3,53	23,69 ± 2,03	24,64 ± 3,59	26,26 ± 1,59	28,67 ± 3,74
Pulmones	10,10 ± 3,65	15,67 ± 2,88	19,12 ± 2,58	20,45 ± 3,29	22,67 ± 3,12	21,03 ± 2,19
Bazo	6,62 ± 2,05	15,83 ± 4,85	20,34 ± 2,66	19,13 ± 2,72	19,11 ± 3,18	18,52 ± 1,71
Tejido Adiposo	6,24 ± 1,54	6,80 ± 1,18	7,30 ± 0,96	8,25 ± 1,81	9,67 ± 1,82	12,34 ± 1,45
Cerebro	5,24 ± 0,31	8,05 ± 0,67	11,27 ± 1,33	11,38 ± 1,42	12,80 ± 1,10	10,45 ± 0,72
Músculo	5,70 ± 0,52	7,01 ± 1,67	9,06 ± 0,34	12,18 ± 1,22	14,38 ± 1,31	12,75 ± 0,89
Adrenales	3,32 ± 0,76	3,36 ± 1,06	5,51 ± 0,71	7,63 ± 0,48	10,47 ± 0,55	10,06 ± 1,42
Testículos	3,15 ± 1,14	4,64 ± 0,76	5,95 ± 0,55	8,79 ± 1,02	9,16 ± 1,20	8,64 ± 1,64
Riñones	21,28 ± 8,23	33,12 ± 14,21	26,61 ± 3,77	20,57 ± 2,21	16,22 ± 1,88	13,20 ± 3,00
Ojos	5,89 ± 1,85	6,59 ± 1,44	12,03 ± 3,31	16,12 ± 2,44	13,25 ± 1,12	12,15 ± 1,01

Tejido	Tiempo de muestreo (h)					
	24	48	72	96	120	144
Hígado	57,98 ± 4,22	36,42 ± 3,52	20,99 ± 5,01	16,41 ± 2,68	12,21 ± 0,54	8,03 ± 0,53
Estómago	15,03 ± 2,21	13,26 ± 1,65	10,93 ± 2,05	7,62 ± 2,25	5,70 ± 1,88	4,18 ± 1,12
Intestino Delgado	37,99 ± 7,23	24,09 ± 6,13	13,69 ± 2,92	9,81 ± 2,57	9,08 ± 1,98	7,00 ± 0,94
Intestino Grueso	15,95 ± 6,41	14,80 ± 3,11	11,67 ± 2,88	7,73 ± 2,02	5,98 ± 1,02	5,13 ± 1,81
Corazón	23,97 ± 1,79	20,48 ± 2,41	18,39 ± 1,94	14,43 ± 1,38	11,62 ± 0,93	9,15 ± 1,10
Pulmones	20,37 ± 1,09	17,58 ± 2,83	12,97 ± 3,18	11,69 ± 1,95	11,33 ± 0,96	9,22 ± 0,63
Bazo	17,27 ± 1,14	16,59 ± 1,97	14,27 ± 2,42	11,67 ± 2,15	9,26 ± 1,19	8,71 ± 1,43
Tejido Adiposo	17,46 ± 2,21	21,29 ± 2,98	23,35 ± 2,61	26,24 ± 3,07	22,04 ± 3,19	16,38 ± 3,40
Cerebro	9,86 ± 0,77	9,23 ± 1,95	6,88 ± 0,60	6,06 ± 1,02	5,09 ± 1,22	4,63 ± 0,87
Músculo	12,35 ± 0,89	10,89 ± 1,79	7,74 ± 2,06	7,28 ± 0,89	6,28 ± 0,81	5,33 ± 0,41
Adrenales	9,24 ± 1,00	8,16 ± 1,88	6,94 ± 0,33	5,29 ± 0,55	3,83 ± 0,51	3,75 ± 0,36
Testículos	10,69 ± 1,03	8,27 ± 1,47	8,76 ± 1,46	8,46 ± 0,70	6,70 ± 0,94	5,99 ± 0,91
Riñones	12,60 ± 2,82	8,18 ± 0,82	8,98 ± 1,06	6,77 ± 0,87	5,77 ± 0,16	4,82 ± 0,31
Ojos	11,77 ± 1,61	10,68 ± 0,72	10,69 ± 2,17	10,60 ± 0,94	10,52 ± 0,98	6,49 ± 1,18

Tabla 1. Niveles de RT (μgEq de ^3H -octacosanoico/g) en órganos y tejidos tras la administración oral de ácido octacosanoico marcado con tritio. X media, DE desviación estándar para n = 3 animales.

$\mu\text{gEq/g}$ a las 6 h, mientras en el intestino delgado se produce lo contrario, en la primera hora la RT aumenta de 35,72 $\mu\text{gEq/g}$ hasta una concentración máxima prácticamente el doble de la inicial (67,57 $\mu\text{gEq/g}$, Tabla 1). A las 6 h los valores de RT en este tejido (48,7 $\mu\text{gEq/g}$) son aún altos con relación a los del estómago. En el intestino grueso porción distal el valor relativo de AUC acumulada es aún bajo, lo que se corresponde con los reducidos valores iniciales de RT (13,66 μgEq a los 15 min y 20,96 $\mu\text{gEq/g}$ a la hora, Tabla 1). Sin embargo, a las 6 h ya se ha producido un discreto y sostenido incremento de la RT hasta un valor de 29,88 $\mu\text{gEq/g}$ (Tabla 1). Este hecho hace que los valores de AUC acumulada se desplacen de la sexta posición en el intervalo 0-2 h a la posición cuarta. Además,

debe notarse como en los intervalos de tiempo 0-2 y 0-6 h los niveles de AUC acumulada en estómago, intestino delgado e hígado son mayores que en plasma. (Fig. 3).

En el intervalo 0-2 h los valores de AUC acumulada de los restantes órganos y tejidos se pueden clasificar en dos grandes grupos; uno en que los niveles de RT son intermedios, al que pertenecen los riñones, intestino grueso en su porción distal, el corazón, los pulmones y el bazo, y otro grupo que representa los órganos y tejidos con menores concentraciones de RT, al que pertenecen ojos, cerebro, músculo, tejido adiposo, testículos y glándulas adrenales. No obstante, en la medida que avanza el tiempo de muestreo, las AUC acumuladas se incrementan relativamente, disminuyendo la diferencia obser-

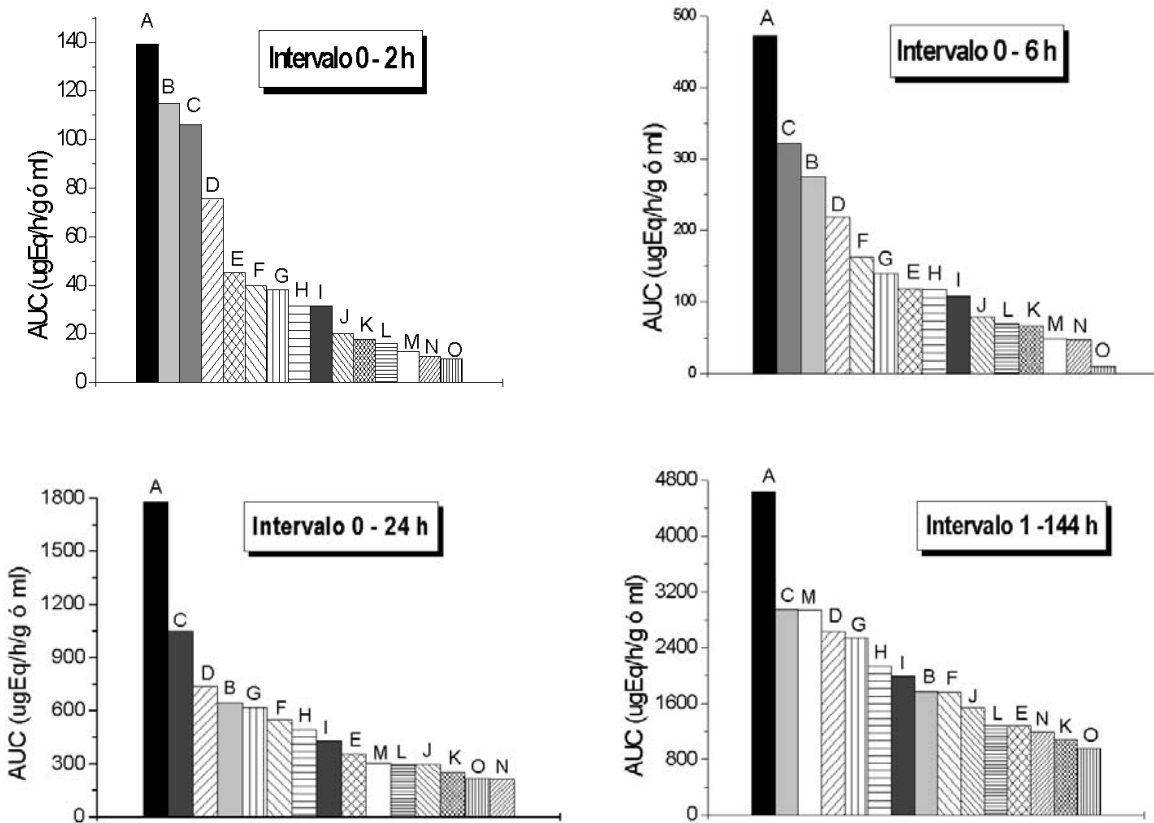


Figura 3.

vada entre los órganos de estos grupos y los pertenecientes al grupo de mayor concentración radioactiva, con excepción del hígado. Además, se observan modificaciones notables en la posición relativa de AUC acumulada, como es el caso de los riñones y el tejido adiposo. En el primero, se aprecia como la concentración de RT aumenta en la primera hora y posteriormente declina, hasta que a las 24 h es la tercera parte del valor encontrado a la hora (Tabla 1) y finalmente continúa decreciendo hasta un valor de 4,82 $\mu\text{gEq/g}$ de tejido. Este hecho hace que los AUC acumulada en este órgano se desplace de una quinta posición en el primer intervalo de muestreo (0-2h) a lugares inferiores dentro de su grupo y que finalmente descienda a valores cercanos a los del músculo y los testículos, que pertenecen al grupo con menor concentración radioactiva (intervalo 0-144 h, Fig. 3). Por el contrario, el tejido adiposo en las primeras 6 h es uno de los tejidos con menor acumulación de RT (intervalo 0-6 h, Fig. 3), pero a diferencia de los restantes sus valores de AUC acumulada van aumentando progresivamente a lo largo de la experiencia de tal manera que sus valores de AUC acumulada se desplazan hacia posiciones

de mayor concentración radioactiva al final del experimento (intervalo 0-144 h, Fig. 3).

Excreción de la RT en heces y orina

La Tabla 2 muestra el perfil de excreción de la RT tras la administración oral del compuesto marcado. A las 144 h de la administración oral, la excreción en heces alcanza un valor de 63,30% de la dosis total administrada, mientras que en orina estos valores fueron de un 24,7%. El curso temporal de la excreción en heces muestra que el mayor porcentaje se excreta durante las primeras 48 h, de tal manera que a las 24 y 48 h se ha excretado un 26,8% y un 46,6% de la RT, respectivamente.

La Tabla 3 muestra la excreción urinaria y fecal tras la administración iv del compuesto marcado. Los resultados muestran que la excreción de la RT a través de las heces (43,42%) es solo ligeramente mayor que la urinaria (40,39%). A los 6 días de haberse administrado por vía oral, sólo se ha eliminado el 63,34% de la dosis radioactiva (heces + orina), mientras que 2 días después de haberse realizado la administración iv, la eliminación acumulada total (heces + orina) es ligeramente menor aún menor (54,42%).

Período de colecta (h)	% de la dosis total administrada					X ± DE
	Animal					
	Heces					
	1	2	3	4	5	
0 - 24 h	23,42	25,67	30,13	28,97	25,64	26,76 ± 2,44
0 - 48 h	38,75	45,23	51,64	49,67	47,52	46,56 ± 4,45
0 - 72 h	43,54	51,28	57,32	57,59	59,21	53,78 ± 5,79
0 - 96 h	47,21	56,32	60,21	61,29	63,29	57,66 ± 5,69
0 - 120 h	50,12	58,89	62,17	64,01	67,37	60,51 ± 5,87
0 - 144 h *	55,2	60,7	65,3	66,3	69,0	63,3 ± 4,8
	Orina					
0 - 24 h	13,78	9,29	15,18	13,89	15,74	13,47 ± 2,54
0 - 48 h	16,61	11,74	20,38	17,12	18,07	16,78 ± 3,17
0 - 72 h	20,62	13,74	22,30	26,05	20,97	19,26 ± 3,35
0 - 96 h	22,64	15,79	24,33	21,97	22,95	21,27 ± 3,34
0 - 120 h	24,72	17,86	26,05	24,93	24,93	23,12 ± 3,30
0 - 144 h *	25,5	19,0	27,9	25,8	25,3	24,70 ± 3,0
Total (heces + orina) *	80,7	79,7	93,2	92,1	94,3	88,0 ± 6,4

Tabla 2. Excreción de la RT acumulada tras la administración oral de ³H-octacosanoico (40 mg/kg).

* Porcentaje aproximado a la primera cifra decimal, X media, DE desviación estándar.

Período de colecta (h)	% de la dosis total administrada			X ± DE
	Animal			
	Heces			
	1	2	3	
0 - 24 h	11,15	10,72	13,24	12,20 ± 1,13
0 - 48 h	19,87	28,34	34,23	27,10 ± 5,93
0 - 72 h	25,42	34,18	39,02	32,22 ± 5,64
0 - 96 h	28,37	36,14	43,11	35,74 ± 6,02
0 - 120 h	33,12	42,69	45,77	39,45 ± 5,41
0 - 144 h *	38,30	44,70	48,54	43,42 ± 4,23
	Orina			
0 - 24 h	21,43	18,21	23,12	22,28 ± 2,15
0 - 48 h	25,37	24,33	29,26	27,32 ± 2,18
0 - 72 h	28,47	31,21	33,12	30,80 ± 1,91
0 - 96 h	32,65	32,65	36,32	34,39 ± 1,66
0 - 120 h	35,88	36,54	38,23	37,06 ± 0,99
0 - 144 h *	38,23	40,21	42,56	40,39 ± 1,17
Total (Heces + Orina)	76,53	84,00	91,70	84,12 ± 6,19

Tabla 3. Excreción de la RAT acumulada tras la administración endovenosa de ³H-octacosanoico (40 mg/kg).

* Porcentaje aproximado a la primera cifra decimal, X media, DE desviación estándar.

Absorción

La cantidad de RT absorbida, estimada de acuerdo al cociente de excreción renal tras la administración oral y endovenosa del compuesto marcado es de 61,15% (Tabla 4).

Metabolismo del ácido octacosanoico**Distribución de la RT en tejido hepático**

A las 2 h de la administración oral del compuesto marcado, el porcentaje de RT asociada a los lípidos con relación a la RT del tejido hepáti-

Parámetro	Oral	Endovenosa
t _{1/2} (h)	70,15	54,02
C _{max} plasmática (µgEq/ml)	54,99	-
Tiempo para alcanzar la C _{max} (min)	30	-
Cantidad absorbida (%)	61,15	-
Excreción urinaria (%)	24,7 ± 3,0	40,39 ± 1,17
Excreción en heces (%)	63,3 ± 4,8	43,42 ± 4,23
AUC total (µgEq/h/ml)*	2728,5	9904,2

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral y endovenosa del ³H-octacosanoico. * AUC extrapolada hasta infinito.

Distribución a las 2 h		
% *	Estructuras lipídicas	% **
76,1 ± 14,0 %	Acidos grasos libres	38,6 ± 2,8
	Fosfolípidos	22,5 ± 2,7
	Ésteres de colesterol	11,9 ± 1,2
	Triglicéridos	11,5 ± 1,2
Distribución a las 10 h		
57,6 ± 2,9 %	Fosfolípidos	25,6 ± 2,4
	Ésteres de colesterol	15,8 ± 1,4
	Triglicéridos	10,2 ± 2,8
	Acidos grasos libres	10,2 ± 2,8

Tabla 5. Distribución de la RT en hígado a las 2 y 10 h de ser administrado el ³H-octacosanoico. * Porcentaje de radiactividad referido RT en el tejido. ** Porcentaje de radiactividad referido a la RT del extracto lipídico. X, media, DE, desviación estándar. Los datos representan los valores obtenidos en muestras provenientes de tres animales de cada tiempo experimental.

co fue de un 76,1% (Fig. 4). El análisis cromatográfico del extracto lipídico mostró que el mayor porcentaje (38,6%) migraba con la mancha de los ácidos grasos libres, el 22,5% con los fosfolípidos, el 11,5% con la mancha correspondiente a los triglicéridos y un 11,9% se encontraba en forma de ésteres de colesterol (Tabla 5).

El estudio de la distribución de RT en el tejido hepático a las 10 h de la administración indicó que el % de RT presente en el extracto lipídico había disminuido a un 57,6% (Fig. 4). Por su parte, la distribución de la RT dentro del extracto lipídico mostró un marcado descenso de la RT presente en los ácidos grasos (10,2%), un descenso discreto de la asociada a los triglicéridos (10,2%), mientras la asociada a los fosfolípi-

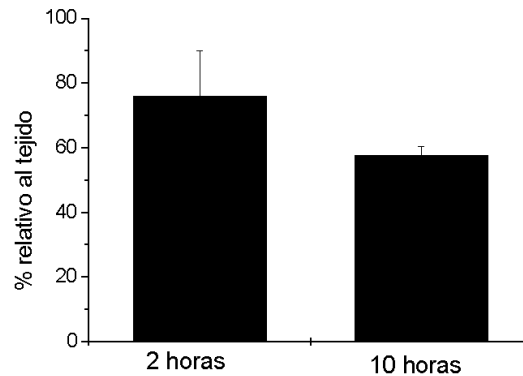


Figura 4. Porcentaje de radiactividad total en los lípidos de tejido hepático a las 2 y 10 h de la administración oral del ³H-octacosanoico. Los valores de las barras representan el valor medio ± desviación estándar de 3 animales en cada tiempo experimental

dos (25,6%) y ésteres de colesterol (15,9%) aumentaron modestamente (Tabla 5).

Distribución de la RT en plasma

Un estudio similar al previamente descrito en hígado fue realizado en las muestras de plasma colectadas a las 2 h (Tabla 6). Como se observa, la extracción de la fase orgánica del plasma mostró que el 88,2% de la RT sistémica pertenecía al extracto lipídico. En este caso, la distribución de RT de dicho extracto en los diferentes lípidos mostró un 30,0% en triglicéridos, un 25,1% en ácidos grasos libres, un 18,5% en fosfolípidos y un 11,0% en forma de ésteres de colesterol.

Tras la obtención de las diferentes clases de lipoproteínas plasmáticas, la determinación de la RT presente en las diferentes fracciones mostró que el mayor porcentaje (52,6%) migró con las partículas de VLDL, el 15,8% con las HDLs y el 7,2% con las LDLs, lo cual indica que la mayor cantidad de RT (75,6%) migra en las lipoproteínas, mientras que sólo el 24,7% se encuentra en el plasma residual.

% *	Estructuras lipídicas	% **
88,2 ± 3,5 %	Triglicéridos	30,0 ± 3,2
	Acidos grasos libres	25,1 ± 4,2
	Fosfolípidos	18,5 ± 3,5
	Ésteres de colesterol	11,0 ± 1,8

Tabla 6. Distribución de la RT en plasma al cabo de las 2 h de ser administrado el ³H-octacosanoico. * Porcentaje de radiactividad referido RT en el tejido. ** Porcentaje de radiactividad referido a la RT del extracto lipídico. X, media, DE, desviación estándar. Los datos representan los valores obtenidos en muestras provenientes de tres animales de cada tiempo experimental.

Fracción de plasma	% de RT /plasma total
VLDL	52,6 ± 1,4
HDL	15,8 ± 2,2
LDL	7,2 ± 0,7
Total transportado en lipoproteínas	75,6 ± 1,5
Plasma residual	24,7 ± 1,2

Tabla 7. Distribución de la RT plasmática en las lipoproteínas y el plasma residual. X, media, DE, desviación estándar. Los datos representan los valores obtenidos en muestras provenientes de tres animales.

DISCUSIÓN

Estudio de los niveles plasmáticos de RT

El curso temporal de la RT plasmática tras la administración oral del compuesto marcado muestra una rápida absorción, sustentada en valores relativamente elevados alcanzados a los 15 min de la administración y que la máxima concentración plasmática se alcance a los 30 min. Tras alcanzar estos niveles, la caída de la RT es muy lenta, lo que resulta consistente con el valor encontrado del $t_{1/2}$ en la fase de eliminación. La variabilidad interanimal de los valores de RT encontrados puede encontrarse influenciada por las características liposolubles del compuesto marcado. Tras la administración iv del compuesto marcado, los valores de RT descienden más rápidamente que tras la administración oral. Las características del perfil temporal de RT apuntan hacia una distribución bifásica, que se manifiesta con más claridad, como es común para diferentes compuestos, tras su administración iv.

Distribución en tejidos

Los resultados del estudio de biodistribución muestran que tras la absorción del compuesto marcado, desde los primeros min la RT se distribuye notablemente en los diferentes tejidos bajo estudio. Sin embargo, existen diferencias en la distribución de la RT entre ellos, de tal modo que durante todo el estudio el hígado resultó el órgano de mayor acumulación y retención de RT. Además, la disminución paulatina de la RT en el estómago, su incremento en intestino y su más tardío incremento en la porción distal del intestino grueso podrían estar relacionadas con la velocidad de tránsito en el tracto gastrointestinal de esta especie, con la velocidad de vaciado estomacal y con la llegada del bolo radioactivo administrado al extremo proximal del intestino y su posterior llegada al intestino grueso. Se observa junto a ello, que en el intervalo de tiempo

0-2 h los niveles de AUC acumulada en estómago, intestino delgado e hígado son mayores que en plasma, lo que sugiere que una vez administrado el compuesto marcado, desde el inicio se produce una acumulación preferencial de RT en estas estructuras, lo cual podría relacionarse con un efecto de primer paso a nivel intestinal y hepático que conlleve a la disminución relativa de la RT en plasma.

Como tendencia general puede apreciarse que en la medida que avanza el tiempo de muestreo las AUCs acumuladas en los órganos de menor concentración radiactiva se incrementan relativamente de tal manera que disminuye la diferencia entre estos y las AUC acumuladas en los órganos de mayor concentración de RT, con excepción del hígado. Este hecho se debe en parte a que los órganos con mayores niveles de RT muestran un decremento ulterior de estos valores con el tiempo, disminuyendo así su AUC acumulativa y a que en otros con menor concentración inicial, como es el caso del corazón, el bazo y los pulmones la RT se incrementa entre los 15 min y las 2 h, a partir de ese momento se mantiene casi constante hasta las 24 h. Además, aunque en todos estos órganos los niveles de RT disminuyen a partir de las 24 h, los niveles a las 144 h son cercanos a los 10 $\mu\text{gEq/g}$, lo que sugiere que eliminan la RT más lentamente.

Sin embargo, un caso distintivo en este análisis lo presenta el tejido adiposo, uno de los que presentan menor acumulación de RT a las 24 h, puesto que su evolución es totalmente diferente a la del resto mostrándonos un incremento progresivo de los valores de AUC acumulada a lo largo del estudio. La diferencia tan notable entre la distribución de RT en este tejido y en los restantes investigados puede estar relacionado con la naturaleza liposoluble del compuesto administrado y su incorporación a las fracciones de VLDL y triglicéridos demostrada en la experiencia de metabolismo.

Excreción de la RT en heces y orina

Los estudios de excreción muestran que heces son la vía fundamental de excreción de la RT tras la administración oral del compuesto, aunque la excreción urinaria muestra una contribución apreciable. El curso temporal de la excreción en heces muestra que el mayor porcentaje se excreta durante las primeras 48 h. Este hecho es congruente con el perfil de distribución de la RT en estómago e intestino delgado, ya que en estos órganos se observa retención

de la RT en ese intervalo de tiempo. La excreción acumulada urinaria y fecal tras la administración iv del compuesto marcado muestra que la excreción de la RT por heces es superior, aunque la diferencia no es tan marcada como en el caso de la excreción tras la administración oral.

Por otro lado, la lenta eliminación de la RT congruente con los niveles plasmáticos de RT encontrados en ese intervalo de tiempo y con la evolución de la RT en los diferentes órganos, indicándonos que una vez absorbido, la marcada distribución y retención tisular de la RT retardan su excreción por las vías fundamentales de eliminación.

Absorción

La absorción de la RT a través del tracto gastrointestinal es rápida, como lo indican los niveles de RT obtenidos a los 15 min de la administración y el máximo plasmático observado a los 30 min. Los altos niveles de RT detectados estómago a los 15 min sugieren que la RT pasa a través de la mucosa gástrica y que por ende, es muy posible que uno de los sitios primarios de absorción sea a nivel del estómago. Sin embargo, también en intestino delgado se obtienen niveles elevados de concentración radioactiva, lo que también sugiere la posible absorción del compuesto marcado por el intestino delgado. Este último hecho resulta lógico si tenemos en cuenta la naturaleza lipídica del compuesto administrado y que el mayor sitio de absorción de las grasas es el intestino delgado en su porción proximal ⁵.

La cantidad de RT absorbida de acuerdo al cociente de las excreciones urinarias tras ambas vías de administración, fue de un 61,15% de la dosis radiactiva total administrada, lo que indica que la RT administrada por vía oral se absorbe apreciablemente (> 50%). La tasa de absorción de radioactividad se estimó a partir del cociente de RT excretado por orina luego de administrar oralmente el producto en relación con el excretado luego de administrarlo endovenosamente, lo cual no significaría que el ácido octacosanoico sea efectivamente la sustancia que se biodispone sistémicamente tras la administración oral, sino que se sumarían metabolitos originados presistémicamente tanto a nivel de la mucosa gastrointestinal como de las células hepáticas y demás estadios previos a la aparición de masa administrada en la gran circulación sanguínea.

Teniendo en cuenta que por las heces se excreta un 63,3% de la radioactividad administrada, resulta probable que la excreción de la bilis

y la recirculación enterohepática contribuyan a la lenta eliminación de la RT plasmática. No obstante, para confirmar esta suposición se requiere la realización de estudios en ratas con el conducto biliar canulado.

Metabolismo del ácido octacosanoico

Teniendo en cuenta que la alta concentración de RT presente en hígado desde los primeros intervalos de tiempo sugería un efecto de primer paso a este nivel, se investigaron aspectos del metabolismo del ácido octacosanoico en este tejido.

El análisis de estos resultados muestra su consistencia, ya que resulta lógico que los porcentajes de RT asociados a las fracciones lipídicas del tejido hepático y del plasma representen la mayor parte de la RT presente en ambos tejidos, considerando la naturaleza lipídica del compuesto administrado. A su vez, este hecho indica que no ha existido un apreciable intercambio isotópico entre la molécula utilizada para los estudios y el agua corporal, ya que el alto porcentaje asociado a lípidos indica que la RT presente en el tejido es en su mayoría proveniente directamente del 3H-octacosanol o bien de algún(os) metabolito(s) generados a partir de éste. Este hecho reviste especial importancia para este estudio, en el cual el marcaje del ácido octacosanoico con tritio era de tipo inespecífico, lo cual puede traer como consecuencia el marcaje en posiciones lábiles de la molécula susceptibles a intercambios con el agua corporal. Es conocido que en el caso de los compuestos marcados con tritio el intercambio isotópico con los líquidos corporales puede introducir errores en las determinaciones de radioactividad total ¹⁰.

Este estudio también indica de manera concluyente que el ácido octacosanoico es metabolizado en el tejido hepático. Así, el hecho que el porcentaje de RT asociada al extracto lipídico respecto a la total del tejido disminuya con el tiempo sugiere la posible degradación paulatina del ácido. En tal sentido, otros autores han demostrado la degradación de los ácidos de cadena muy larga a nivel de los peroxisomas hepáticos. La β -oxidación perioxosomal, proceso mediante el cual la cadena alifática se acorta, produciendo restos de acetyl CoA ¹²⁻¹⁴, puede explicar la paulatina disminución que se observa en la RT presente en la mancha de ácidos grasos del tejido hepático y en la fracción lipídica total, puesto que los restos de acetyl CoA marcados isotópicamente pueden incorporarse paulatinamente a otras vías metabólicas no lipídicas, pasando a formar parte de la RT del tejido.

Por otro lado, la aparición de radioactividad en fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos del tejido hepático nos indica la posible esterificación del ácido octacosanoico o de sus metabolitos de cadena más corta a estos compuestos lipídicos que son componentes de la membrana celular y de diferentes organelos ¹⁵. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Kabir & Kimura ¹⁶⁻¹⁸, ya que estos autores demostraron, mediante el uso del octacosanol marcado con ¹⁴C, la conversión "*in vivo*" de éste a su forma ácido y la esterificación posterior del ácido generado o sus metabolitos a diferentes lípidos del tejido hepático.

Un aspecto relevante de este estudio atañe a los resultados de la distribución de la RT en plasma. Al igual que lo que ocurre en el tejido hepático, un porcentaje alto de la RT plasmática se localiza en la fracción lipídica y se distribuye en diferentes estructuras lipídicas, indicándonos la esterificación del ácido o de sus metabolitos. El mayor porcentaje de la RT se asocia a la mancha de triglicéridos y coincidiendo con este hecho, la zona del gradiente en que migran las VLDLs presenta la mayor concentración radioactiva de todas las lipoproteínas. En tal sentido, es conocido que en el proceso de absorción de las grasas en el intestino delgado, los triglicéridos presentes en la dieta son degradados por la acción de la lipasa pancreática y los ácidos grasos provenientes de esta degradación penetran en el enterocito por difusión pasiva y/o por transporte facilitado por proteínas transportadoras de ácidos grasos. Posteriormente, estos ácidos son transportados en el retículo endoplasmático y utilizados en la resíntesis de triglicéridos, los cuales se transportan a través de los quilomicrones. Los quilomicrones y/o quilomicrones remanentes resultantes de la acción de la lipoproteína lipasa se utilizan posteriormente por el hígado en la formación de las VLDLs ¹⁹.

De este modo, si tenemos en cuenta que la mayor cantidad de RT se encuentra presente en las VLDLs y que hemos administrado un ácido graso de cadena muy larga marcado isotópicamente, resulta plausible pensar que la radioactividad presente en la fracción de VLDL circulantes en el plasma provenga del metabolismo del ³H-octacosanoico a nivel intestinal. Esta hipótesis sugiere que el metabolismo del ácido octacosanoico no solamente se produce en el tejido hepático, sino que puede comenzar a producirse a nivel intestinal, lo cual parece lógico si tenemos en cuenta que en este tejido se acumulan y retienen grandes concentraciones radioac-

tivas. De este modo, ulteriores estudios deberán investigar el metabolismo del ácido en esta estructura.

Por otro lado, como habíamos señalado en los estudios de biodistribución, el tejido adiposo presenta una cinética de distribución de radiactividad diferentes a la de los restantes tejidos, de tal manera que incrementa paulatinamente los niveles de concentración radiactiva en el tiempo. Este hecho nos resulta congruente con los estudios del metabolismo y con el hecho de que una porcentaje considerable de la RT se encuentre unido a las VLDL, puesto que el tejido adiposo tiene la capacidad de almacenar los triglicéridos en virtud de la acción de importantes cantidades de lipasas que pueden catalizar el depósito de los triglicéridos provenientes del torrente circulatorio y transportados en las VLDLs ²⁰.

En resumen, tras la administración oral de ³H-octacosanoico, la máxima concentración plasmática tras la administración oral se alcanza a los 30 min. El valor medio encontrado para ese punto fue de $54,99 \pm 6,10$ μ gEq de ácido octacosanoico/ml de plasma. Tanto tras la administración oral como (iv), la caída de la radiactividad total (RT) es muy lenta, observándose valores elevados del $t_{1/2}$ de eliminación. Tras la absorción la RT se distribuye notablemente en diferentes tejidos, aunque el hígado es el órgano donde más se localiza a lo largo de todo el estudio. Durante las primeras 6 primeras h la RT se distribuye preferentemente en hígado, estomago e intestino delgado, donde las concentraciones son superiores a las del plasma. Las concentraciones de RT en tejido adiposo, al inicio son bajas, pero posteriormente se incrementan gradualmente hasta llegar a valores elevados al finalizar la experiencia. Por la vía oral, la vía excreción de la RT es principalmente por heces (63,3%) aunque por la orina se excreta un 24,7% de la dosis administrada. La excreción acumulada urinaria y fecal tras la administración iv del compuesto marcado muestra que la excreción de la RT por heces es superior, aunque la diferencia entre ambas vías no es tan marcada como en el caso de la excreción tras la administración oral. Por ambas vías de administración, la eliminación de la RT es lenta, lo cual es congruente con la marcada distribución y retención tisular de la RT en los tejidos. La absorción del compuesto marcado a través del tracto gastrointestinal es rápida, a juzgar por los niveles de RT plasmática a los 15 min y el máximo de concentración observado a los 30 min. Los estudios de biodistribución sugieren que la absorción puede

producirse a nivel del estomago e intestino delgado. La cantidad absorbida fue de un 61,15%, de acuerdo al coeficiente de excreción urinaria por ambas vía. Al cabo de las 2 h posteriores a la administración oral, la mayor parte de la RT presente en hígado y plasma esta asociada a la fracción lipídica, lo cual resulta congruente con la naturaleza lipídica del compuesto administrado. Sin embargo, la disminución del porcentaje de RT asociada al extracto lipídico respecto a la total del tejido hepático en el tiempo, sugiere la posible degradación paulatina del ácido. La aparición de radioactividad en fosfolípidos, triglicéridos y esteres de colesterol del tejido hepático y del plasma indican la posible esterificación del ácido octacosanoico o de sus metabolitos a estos compuestos lipídicos. Un porcentaje alto de la RT plasmática se transporta en las lipoproteínas preferentemente en la fracción donde mi-

gran las VLDLs, lo cual es congruente con el incremento paulatino de la RT en tejido adiposo.

Sin embargo, aunque los resultados de este estudio son lógicos teniendo en cuenta la estructura del compuesto marcado y las evidencias acerca del metabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga, nuestro estudio tiene dos limitantes fundamentales. Por una parte, hemos trabajado en términos de RT y por otra, la molécula utilizada está marcada con tritio de manera inespecífica. El reconocimiento de estas limitaciones indica que debemos abordar el estudio del metabolismo del ácido octacosanoico utilizando una molécula marcada específicamente en el esqueleto carbonado, lo que nos permitiría la identificación del ácido octacosanoico de un modo más preciso, así como el seguimiento temporal de sus metabolitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González, L., D. Marrero, A. Laguna, R. Más, L. Arruzazabala, D. Carbajal., M. Cora & R. Menéndez (1998) Laboratorios Dalmer SA, assignee: amixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. Republic of South Africa patent 98-2744. December 30, 1998.
- Menéndez R., R. Mas, Y. Pérez, R. González & S. Jiménez (2004) *Can J. Physiol. Pharmacol.* **82**: 22-9.
- Castaño G., R. Menéndez, R. Mas., N. Ledon, J. Fernández, Y. Pérez, R. González & M. Lescay (2003) *Clin. Drug. Invest.* **23**: 193-203.
- Castaño G., R. Mas, L. Fernández, E. López, J. Gutiérrez, J. Fernández, R. Gamez & E. Álvarez (2002) *Drug Res. Develop.* **3**: 337-48.
- Menéndez R., R. Mas, A. Amor, I. Rodeiros, R.M. González & J.L. Alfonso (2001) *Pharmacol. Res.* **44**: 299-04.
- Molina, V., L. Arruzazabala, D. Carvajal, R. Mas & S. Valdés (2000) *Pharmacol. Res.* **42**: 137-43.
- Arruzazabala. ML, V. Molina, R. Mas, L. Fernández, D. Carbajal, S. Valdés & G. Castaño. (2002) *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **29**:891-7.
- Menéndez R., R. Mas, A.M. Amor, N. Ledon, Y. Perez, R.M. Gonzalez., I. Rodeiro & M.S. Zayas Jiménez (2002) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**: 13-21.
- Vega, L., L.Ducat & L. García (1993) *Nucleus.* **13**: 12-6.
- Evans, E. (1974) *Tritium and its compounds.* London, Butler Worths.
- Terpsta A.H.M., C.J.H. Woodward & F.J. Sánchez-Muñiz (1981) *Anal. Biochem.* **111**: 149-51.
- Singh, H. & A.A. Poulos (1986) *Arch Biochem Biophys.* **250**: 171-9.
- Singh, H, N. Derwas & A.A. Poulos (1987) *Arch Biochem Biophys.* **359**: 382-90.
- Wanders, R.J.A., C.W.T. Van Roermund & M.J.A. Van Wijland (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **919**: 21-5.
- Stryler, L. (1999) *Fatty Acids Metabolism.* In: *Biochemistry*, Chapter 24, p-603. Lubert Stryler Ed. W.H. Freeman and Company. New York.
- Kabir Y & S. Kimura (1993) *Ann. Nutr. Metab.* **37**: 33-38.
- Kabir Y & S. Kimura (1993) *Acta Alimentaria* **24**: 39-46.
- Kabir Y & S. Kimura (1995) *Ann. Nutr. Mea-atb.* **39**: 279-284.
- Zubay, G. (Ed.) (1993) *Metabolism of Cholesterol.* In: *Biochemistry*, pp .635. Oxford: W.C. Brown Publishers.
- Stryler, L. (1999) *Biosynthesis of Membrane Lipids and Steroids.* In: *Biochemistry.* Chapter 27, p-685. Lubert Stryler Ed. W.H. Freeman and Company. New York.