

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUIMICA TERAPEUTICA

ACCIO DE L'ACID CLOFIBRIC I DERIVATS SOBRE SISTEMES ENZIMATICS IMPLICATS  
EN LA SINTESI HEPATICA D'ACIDS GRASSOS.

Tesina que presenta  
Marta Alegret Jordà  
dirigida pel Pr. Dr.  
Joan Carles Laguna Egea  
per la obtenció del  
Grau de Llicenciatura.

Barcelona, 1990.

Als meus pares, Enric i Rosa.

## AGRAIMENTS

Desitjo expressar el meu sincer agraïment a tots aquells que d'una o altra forma m'han ajudat en la realització d'aquest treball, especialment:

- Al Dr. Tomàs Adzet, Catedràtic i Director de la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, per haver-me brindat la possibilitat de dur a terme el present treball.

- Al Dr. Joan Carles Laguna, per haver acceptat la direcció d'aquesta Tesina, i, sobre tot, per la seva amistat, dedicació personal i orientació, sense les quals hagués estat impossible la realització d'aquest treball.

- Al Dr. Josep Iglesias, Catedràtic de Farmacologia, per l'interès mostrat en tot moment.

- Al Dr. Jordi Camarasa, Catedràtic de Farmacologia, pel recolzament i ajut que m'ha brindat.

- A Rosa Sánchez i Manel Merlos, per la seva amistat i col.laboració.

- A Anna Francitorra, Tòfol Talaverón, Marta Martorell, Rosa M<sup>a</sup> Gené, M<sup>a</sup> José Salvía, Toni Camins, Mercè Pallàs, Carmen Núñez, M<sup>a</sup> Carmen Pascual, i a la resta de companys del Departament.

- A M<sup>a</sup> Teresa Iglesias, pel seu inestimable ajut.

- A la Universitat de Barcelona, per l'ajut econòmic concedit al Projecte de Recerca n<sup>o</sup> 37 (Gener 1990), sota el títol "Acció dels derivats de l'àcid p-clorofenoxi isobutíric (àcid clofibrí) sobre la elongació-desaturació microsomal d'àcids grassos".

## INDEX

|  |     |
|--|-----|
| ABREVIACIONS .....   | 1   |
| INTRODUCCIO .....  | 4   |
| PART TEORICA .....   | 8   |
| 1. Metabolisme dels àcids grassos .....  | 9   |
| 2. Hiperlipoproteïnèmies i el seu tractament .....                                     | 20  |
| 3. Proliferadors peroxisòmics .....  | 26  |
| 4. Clofibrat i anàlegs estructurals .....  | 39  |
| 5. Cadenes de transport electrònic microsomal .....                                    | 47  |
| 6. Acil-CoA hidrolasa .....  | 51  |
| PART EXPERIMENTAL .....  | 54  |
| * Metodologia.....   | 55  |
| 1. Animal d'experimentació .....   | 56  |
| 2. Obtenció de les fraccions mitocondrial, citosòlica i<br>microsomal hepàtiques ..... | 56  |
| 3. Obtenció de la fracció citosòlica cerebral .....                                    | 59  |
| 4. Paràmetres enzimàtics determinats .....   | 60  |
| 5. Paràmetres no enzimàtics .....  | 70  |
| * Resultats .....  | 72  |
| I. Identificació de l'acció farmacològica .....  | 73  |
| II. NADH-citocrom c reductasa .....  | 96  |
| III. Acil-CoA hidrolasa .....  | 108 |



|                    |     |
|--------------------|-----|
| DISCUSSIO .....    | 144 |
| CONCLUSIONS .....  | 159 |
| BIBLIOGRAFIA ..... | 164 |

## ABREVIACIONS

ACAT: Acil colesterol aciltransferasa

ACP: Acil carrier protein

apo: apoproteïna

ATP: adenosin trifosfat

BSA: Bovine serum albumin

BZF: Bezafibrat

CFB: Clofibrat

cit: citocrom

CMC: concentració micel.lar crítica

CoA: coenzim A

DEA: Dietanolamina

DEHP: Di(2-etilhexil)ftalat

DTNB: Acid 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoic)

DTT: Ditiotreitol

EDTA: Acid etilendiamino tetracètic

FAD: Flavin adenin dinucleòtid

Fp<sub>D</sub> : NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa

Fp<sub>T</sub> : NADPH-citocrom c reductasa

GFB: Gemfibrozil

HDL: High density lipoprotein

HMG-CoA RD: hidroximetil-glutaril-CoA reductasa

IDL: Intermedium density lipoprotein

LCAT: Lecitin colesterol aciltransferasa

LDL: Low density lipoprotein

LPL: Lipoprotein lipasa

ms: microsomal

mt: mitochondrial

NAD(H): Nicotinamida dinucleòtid (forma reduïda)

NADP(H): Nicotinamida dinucleòtid fosfat (forma reduïda)

Pal-CoA: Palmitoil-Coenzim A

QM: Quilomicrons

REL: Reticle endoplasmàtic llis

rpm: revolucions per minut

Tris: Tris(hidroximetil)aminoetà

VLDL: Very low density lipoprotein

## INTRODUCCIO

L'àcid **clofibríic** o la seva forma esterificada, el **clofibrat**, així com diversos derivats de la seva estructura, **bezafibrat**, **fenofibrat** i **gemfibrozil**, es troben actualment en el mercat farmacèutic espanyol sota la indicació de fàrmacs hipolipemians. Aquests fàrmacs estan, doncs, indicats en el tractament farmacològic de les hiperlipoproteïnèmies, que, segons la Societat Espanyola d'Arteriosclerosi, constitueixen el factor de risc modificable més important en l'establiment de l'arteriosclerosi i la seva seqüela de malalties cardiovasculars.

Específicament, aquests compostos són fàrmacs de primera elecció en el tractament de:

- **Hipercolesterolèmia primària**: S'engloben en aquest apartat les hipercolesterolèmies amb elevació del colesterol plasmàtic (normalment degut a un increment de la concentració de colesterol-LDL plasmàtic circulant), i valors pràcticament normals de triglicèrids. Entre elles destaquen la **hipercolesterolèmia familiar essencial**, la **hiperlipoproteïnèmia poligènica** i la **hiperlipoproteïnèmia familiar combinada**, en els cassos en que l'alteració predominant correspon a les LDL (fenotips **Ila** i alguns **Ilb**). En aquests cassos, els fàrmacs d'elecció seran, entre d'altres, **fenofibrat** i **bezafibrat**.

- **Hiperlipoproteïnèmia familiar combinada**, referint-se en aquest cas al fenotip **Ilb** típic, en què es produeix una elevació conjunta dels nivells de LDL i VLDL. En aquest cas els fàrmacs d'elecció són **gemfibrozil**, **fenofibrat** i **bezafibrat**.

- **Hiperlipoproteïnèmia tipus III**, en la que es produeix una elevació patològica dels nivells circulants de VLDL i IDL, amb el consegüent augment de les concentracions plasmàtiques de colesterol i de triglicèrids. El fàrmac d'elecció serà el **clofibrat**.

- **Hipertrigliceridèmies (tipus IV i V)**, en les que es produeix majoritàriament un increment de triglicèrids, lligats a les VLDL i QM. Els fàrmacs d'elecció serien **gemfibrozil** i **clofibrat**.

Malgrat que l'eficàcia d'aquests fàrmacs és evident, no es coneix encara amb exactitud quin és el mecanisme o mecanismes pels quals es produeix l'efecte hipolipemiant. Entre els mecanismes proposats destaquen:

- . **Inhibició de la síntesi de VLDL**, per afectació de la síntesi hepàtica de triglicèrids.
- . **Estimulació del catabolisme de les LDL**, per activació de les lipoproteïnolipases perifèriques.
- . **Inhibició de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa i estimulació de la expressió hepàtica dels receptors de les LDL.**
- . **Increment de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos**, tant mitocondrial com peroxisòmica.

En qualsevol cas, les modificacions bioquímiques responsables del desencadenament d'aquests processos, no estan encara suficientment delimitades.

Els àcids grassos saturats, mono i poliinsaturats, són els constituents essencials dels fosfolípids de membrana, i dels fosfolípids i triglicèrids integrants de les lipoproteïnes. Una modificació en la composició d'àcids grassos pot alterar la fluïdesa de la membrana, i afectar així molts processos enzimàtics ( Prasad i col., 1986 ).

A part d'aquesta funció estructural, alguns àcids grassos poliinsaturats, com l'àcid araquidònic (20:4 n-6), l'àcid eicosapentanoic (20:5 n-3) i l'àcid adrènic (22:6 n-3), són coneguts precursors biosintètics de prostanoids. Aquests estan involucrats en nombrosos processos fisiològics i patològics, tals com la homeosàsia, trombosi, reaccions al·lèrgiques i processos inflamatoris ( William i col., 1988). Tanmateix, s'ha observat que les dietes riques en àcids grassos poliinsaturats exerceixen un efecte hipolipemiant ( Desreumaux i col., 1977 ), relacionant alguns autors l'increment en l'activitat LPL amb el grau d'insaturació dels àcids grassos integrants dels fosfolípids de les lipoproteïnes plasmàtiques.

Es evident, doncs, que una alteració de la composició quali i quantitativa dels àcids grassos pot repercutir de manera molt important sobre el patró lipoproteic plasmàtic.

L'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar l'efecte "in vitro" de l'àcid clofibrí, bezafibrat i gemfibrozil sobre una sèrie d'enzims hepàtics que intervenen de manera directa o indirecta en el procés de síntesi d'àcids grassos.

En concret, els enzims estudiats han estat:

- Enzims de localització citosòlica:

- . Enzim escissor del citrat
- . Màlic deshidrogenasa
- . Enzim màlic
- . Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa

- Enzims de localització microsomal

- . Cadenes de transport electrònic microsomal:
  - NADH-citocrom c reductasa
  - NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa
  - NADPH-citocrom c reductasa
- . Acil-CoA hidrolasa (també les acil-CoA hidrolases mitocondrial i citosòlica)

Aquest treball s'inclou dins un projecte més ampli on s'avaluarà l'efecte "in vivo" i "in vitro" d'aquests i altres proliferadors peroxisòmics sobre les vies biosintètiques hepàtiques dels àcids grassos.

El coneixement concret de l'activitat d'aquests fàrmacs sobre els enzims esmentats, permetrà clarificar el mecanisme desencadenant de l'efecte hipolipemiant.



PART TEORICA

## 1. METABOLISME D'ACIDS GRASSOS

Els animals obtenen els àcids grassos bé per la dieta, bé per la síntesi "de novo" a partir d'acetil-CoA. La majoria d'àcids grassos són ingerits com a triglicèrids, i, en menor grau, com a fosfolípids i ésters de colesterol.

En l'intestí prim, la **lipasa pancreàtica** degrada els triglicèrids a àcids grassos i 2-monoacilglicerol. Els fosfolípids i ésters de colesterol també són hidrolitzats donant lloc a l'aparició d'àcids grassos lliures. Aquests entren dins l'enteròcit normalment per difusió. Un cop han estat transformats en acil-CoA ésters per acció de l'**acil-CoA sintasa** microsomal, s'utilitzen per resintetitzar triglicèrids, fosfolípids i ésters del colesterol, els quals es complexen amb apolipoproteïnes per formar lipoproteïnes, principalment quilomicrons. Aquests són alliberats a la limfa, i a través del conducte toràcic arriben fins l'unió de les venes subclàvia i jugular, i entren a la sang.

La **lipoproteinlipasa** de l'endoteli vascular, actua sobre els triglicèrids i fosfolípids que transporten les lipoproteïnes, hidrolitzant-los i alliberant àcids grassos. Aquests àcids grassos, juntament amb els que són transportats per l'albumina sèrica, són absorbits llavors per tres tipus de cèl.lules: miòcits, adipòcits i enteròcits.

La utilització dels àcids grassos de cadena llarga que han arribat al citosol cel.lular, requereix la seva conversió en CoA ésters. Les **acil-CoA sintases** estan localitzades en el reticle endoplasmàtic, membrana mitocondrial externa i peroxisomes; per tant, els àcids grassos lliures que han penetrat al citosol cel.lular, hauran de ser transportats a aquests orgànuls per tal de sofrir activació metabòlica. Aquest transport es realitza a través de l'unió dels àcids grassos a unes proteïnes citosòliques anomenades "proteïnes transportadores d'àcids grassos" o "fatty acid binding proteins". Aquestes proteïnes s'encarreguen d'estimular el transport i dirigir els àcids grassos als diferents orgànuls intracel.lulars, així com de protegir els enzims i membranes cel.lulars de l'atac dels àcids grassos i dels acil-CoA ésters (Sweetser, 1987). Recentment, s'ha identificat una nova proteïna citosòlica anomenada "proteïna transportadora d'acil-CoAs" o "acyl-CoA binding protein", la qual, a diferència de l'anterior només és capaç d'unir-se a acil-CoA ésters, però no a àcids grassos (Rasmussen, 1990).

El destí dels acil-CoA ésters formats depèn del tipus de cèl.lula on es trobin: així, en els miòcits, els acil-CoA es destinen sobre tot a la oxidació en la mitocondria per obtenir energia. En els adipòcits i hepatòcits, el destí dels acil-CoA ésters depèn de l'estat nutricional de l'animal: quan hi ha un aport de nutrients adequat, la síntesi d'àcids grassos i la formació de triglicèrids està estimulada. En estat de dejú succeeix el contrari, està estimulada la  $\beta$ -oxidació, que dona lloc a la formació de cossos cetònics. Aquests, juntament amb els àcids grassos lliures constitueixen fonts d'energia per a molts teixits en estat de dejú (Sweetser, 1987).

Els àcids grassos que han de sofrir  $\beta$ -oxidació en la mitocondria, han de ser transferits a la carnitina per poder travessar la membrana mitocondrial. L'enzim que catalitza aquesta transferència és la **carnitinaciltransferasa I**, present en la superfície externa de la membrana interna mitocondrial. Llavors, la **carnitinaciltranslocasa** transporta el complex a través de la membrana interna mitocondrial, on, per acció de la **carnitinaciltransferasa II**, localitzada en la superfície interna de la membrana interna, el grup acil es reconverteix en acil-CoA.

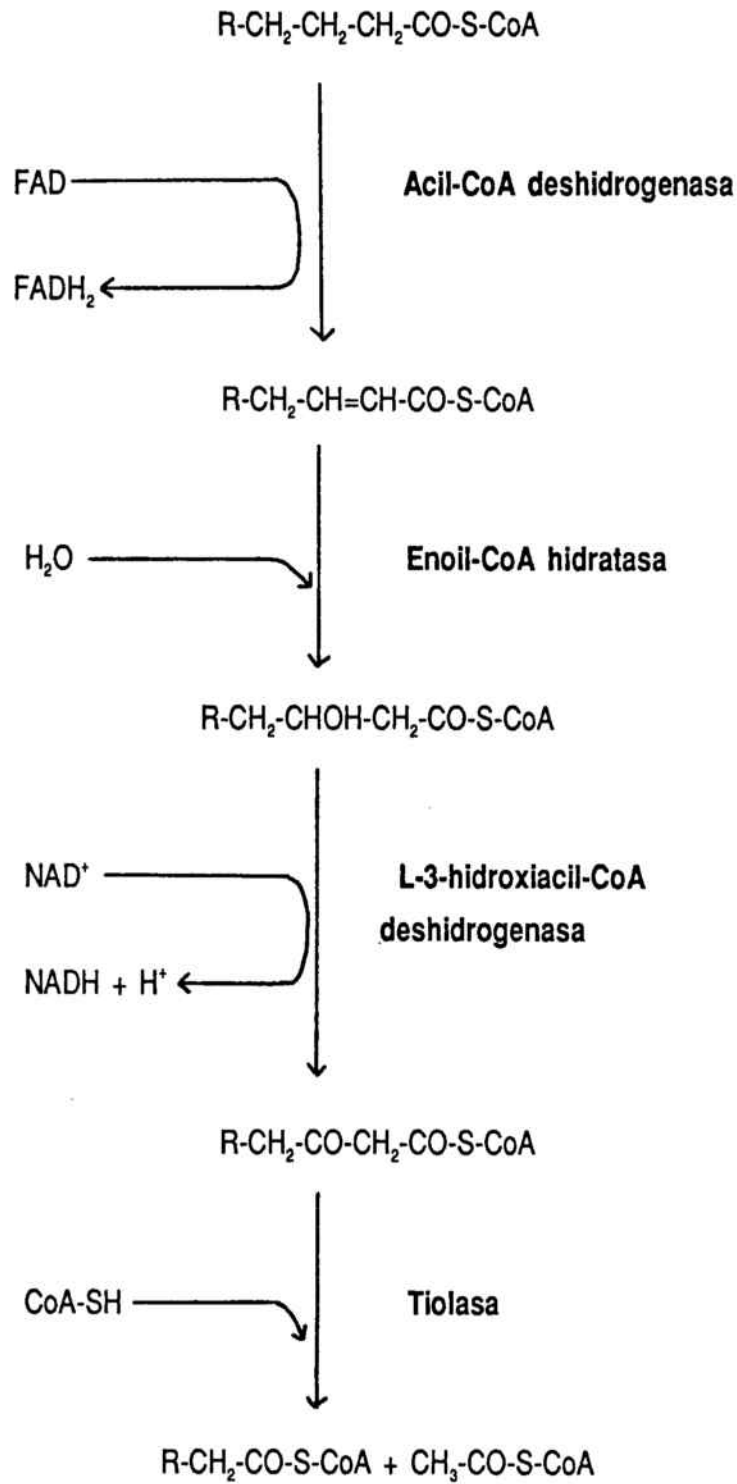
Dins la matriu mitocondrial, l'acil-CoA sofreix un procés de degradació anomenat  $\beta$ -oxidació, que té lloc en quatre fases:

1. Deshidrogenació enzimàtica entre els àtoms de carboni  $\alpha$  i  $\beta$ , formant-se un enllaç doble en la cadena carbonada. L'enzim que catalitza aquesta reacció és l'**acil-CoA deshidrogenasa**, i com a producte s'obté un trans-2-enoil-CoA.

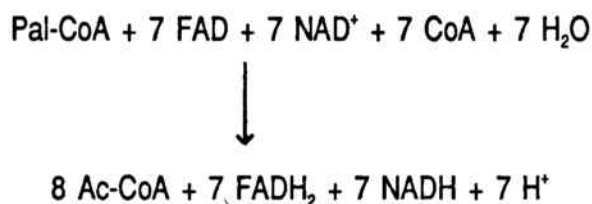
2. Hidratació, etapa en que s'addiciona aigua al doble enllaç format en l'etapa anterior. La reacció, catalitzada per l'**enoil-CoA hidratasa**, és estereoespecífica, doncs només es forma el L-isòmer del 3-hidroxiacil-CoA.

3. Segona oxidació, per acció de la **L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa**, que converteix el grup hidroxil de C-3 en grup ceto i genera NADH.

4. Ruptura del 3-cetoacil-CoA format en l'etapa anterior per acció del grup tiol d'una segona molècula de CoA, formant-se acetil-CoA i un acil-CoA escurçat en dos àtoms de carboni. La reacció està catalitzada per l'**aciltransferasa de l'acetil-CoA** o tiolasa.

Esquema 1.  $\beta$ -oxidació

L'acil-CoA escurçat experimenta llavors un altre cicle d'oxidació, perdent dos àtoms de carboni més, i així successivament. En conjunt, una molècula de palmitoil-CoA (C 16:0) ha de sofrir set cicles d'oxidació, produint vuit molècules d'acetil-CoA. L'estequiometria completa de la  $\beta$ -oxidació del palmitoil-CoA és:



La  $\beta$ -oxidació no només es produeix en la mitocondria sinó també en els peroxisomes. Si bé la contribució de la mitocondria a la  $\beta$ -oxidació és, en condicions normals, del 80-95%, en determinades dietes i tractaments farmacològics pot incrementar-se la contribució de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica ( Brady i col., 1989 ). Això és el que succeeix, per exemple, quan s'utilitzen fàrmacs hipolipemians, com el clofibrat i derivats, que actuen com a proliferadors peroxisòmics, almenys en rosegadors. Els enzims de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica són diferents dels mitocondrials, doncs són insensibles a KCN i generen  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a resultat de la seva acció ( Hawkins i col., 1987 ).

En els peroxisomes, l'àcid gras, usualment de cadena llarga, s'activa a acil-CoA per acció d'una **acil-CoA sintetasa** localitzada en la membrana. Les següents reaccions ténen lloc en la matriu peroxisòmica. L'acil-CoA és reduït per l'**acil-CoA oxidasa** a trans-2-enoil-CoA, consumint  $\text{O}_2$  i rendint  $\text{H}_2\text{O}_2$  . Aquesta és la reacció velocitat limitant. Les dues següents reaccions són catalitzades per una proteïna multifuncional que engloba les activitats **enoil-CoA hidratasa** i **3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa**. La reacció final està catalitzada per la **3-cetoacil-CoA tiolasa**.

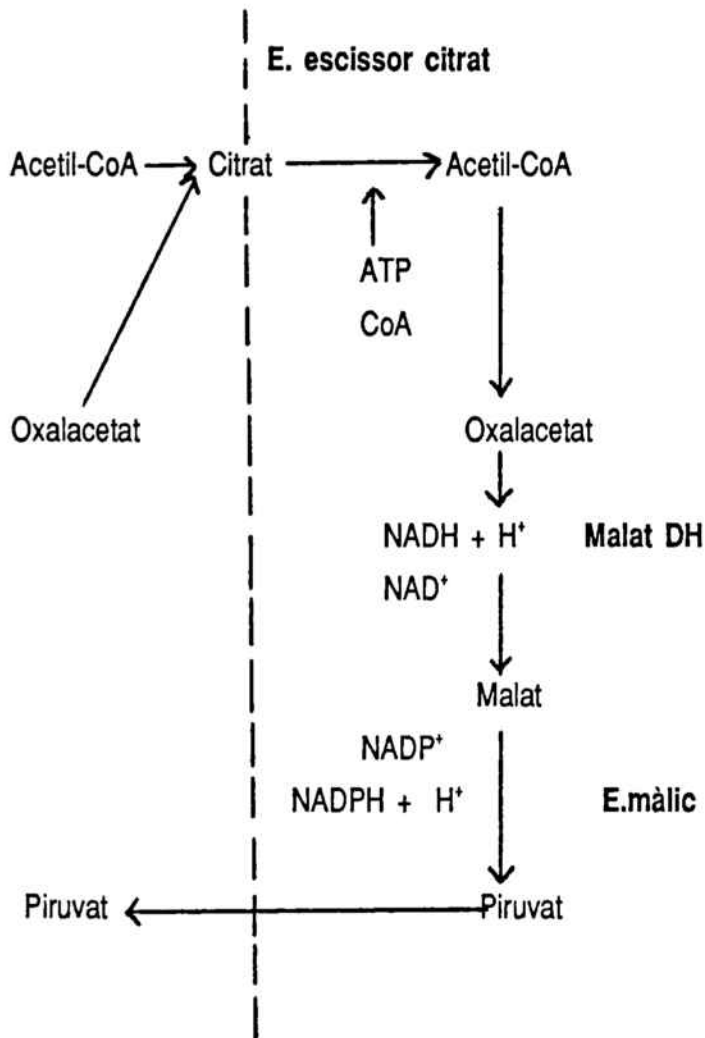
Els acetil-CoA formats en la  $\beta$ -oxidació ténen tres destins dins la cèl.lula:

1. Ser oxidats a  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  en el cicle de l'àcid cítric
2. Formar cossos cetònics (acetacetat, D- $\beta$ -hidroxibutirat i acetona)
3. Síntesi d'àcids grassos

En els organismes superiors, la síntesi d'àcids grassos té lloc al citosol, per acció d'un complex multienzimàtic anomenat **àcid gras sintasa**, constituït pels set enzims que intervenen en la síntesi. En el centre del sistema es troba la proteïna portadora de grups acil ("acil carrier protein"). Aquesta és una molècula que conté un grup prostètic de fosfoproteïna que té per funció esterificar-se amb els intermediaris de la síntesi dels àcids grassos.

L'etapa crucial en la síntesi d'àcids grassos és la carboxilació de l'acetil-CoA per donar malonil-CoA. L'acetil-CoA que s'utilitza prové de la mitocondria, però per sí sol no pot travessar la membrana mitocondrial. Per fer-ho, cal que reaccioni amb l'oxalacetat per formar citrat el qual travessa fàcilment aquesta membrana, passant al citosol. Llavors actua l'**ATP citrat liasa** o **enzim escissor del citrat**, el qual, consumint ATP i CoA, dóna lloc a oxalacetat i acetil-CoA a partir del citrat que ha sortit al citosol. L'oxalacetat, per tornar a entrar en la mitocondria, ha de ser reduït a malat per la **malat deshidrogenasa**; després, el malat és descarboxilat formant-se piruvat, el qual és capaç de entrar dins la mitocondria. Aquesta reacció és catalitzada per l'**enzim màlic**, el qual consumeix  $\text{NADP}^+$  i genera NADPH. Aquest és utilitzat com a font de poder reductor per la síntesi d'àcids grassos

Esquema 2



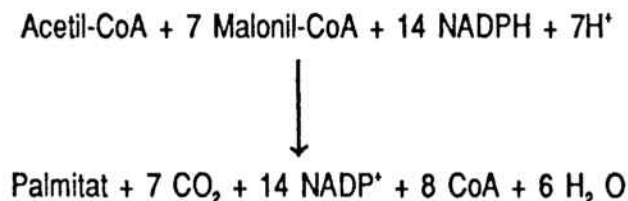
La carboxilació de l'acetil-CoA és una reacció irreversible catalitzada per l'**acetil-CoA carboxilasa**, l'activitat del qual està regulada per fosforilació-desfosforilació (Hardie, 1989). Aquest enzim conté un grup prostètic de biotina. La carboxilació té lloc en dues etapes: primer es forma un intermediari de carboxibiotina a expenses d'un ATP. Llavors el grup CO<sub>2</sub> es transfereix a l'acetil-CoA, formant-se malonil-CoA.

Abans que puguin començar les etapes reals de la síntesi dels àcids grassos, cal que els grups acetil i malonil es transfereixin a l'acil carrier protein, formant-se acetil-ACP i malonil-ACP. Aquests dos es condensen, formant acetacetil-ACP i alliberant  $\text{CO}_2$ . Les tres etapes següents són:

1. Reducció de l'acetacetil-ACP a D-3-hidroxi-butiril-ACP, actuant el NADPH com a agent reductor
2. Deshidratació del D-3-hidroxi-butiril-ACP a crotonil-ACP
3. Reducció del crotonil-ACP a butiril-ACP. La font de poder reductor és també el NADPH

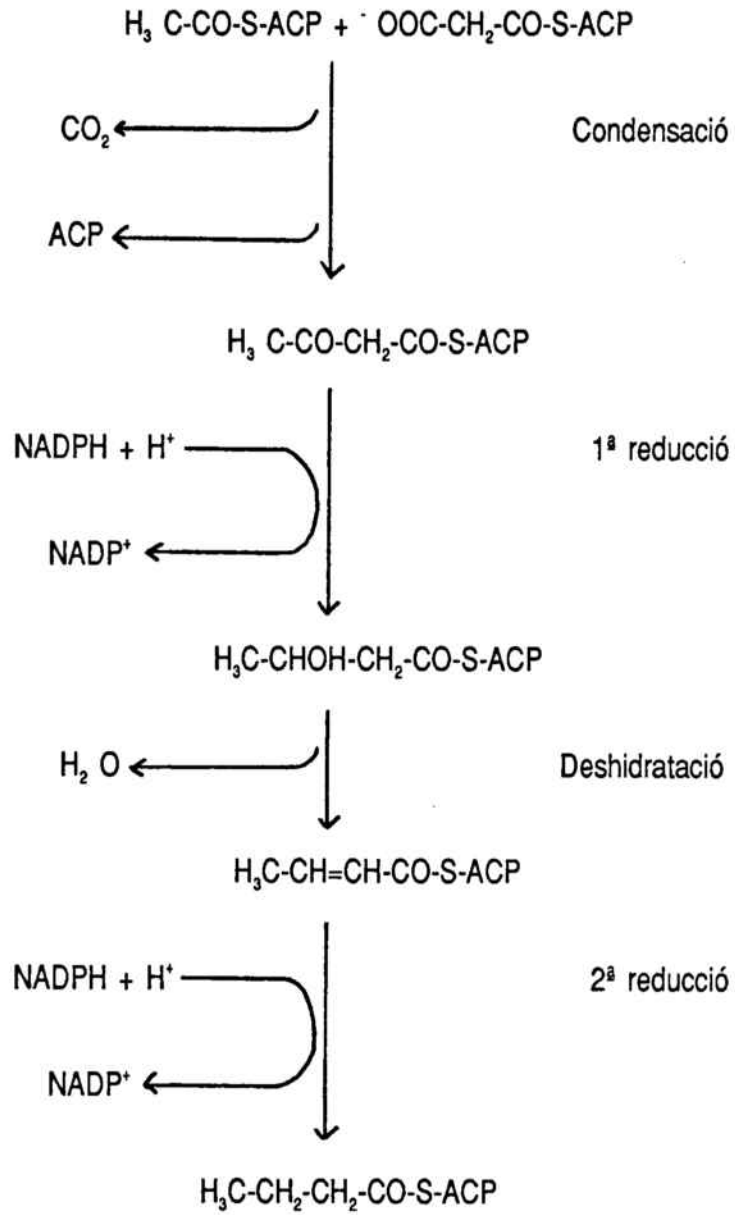
En el segon cicle de la síntesi, el butiril-ACP es condensa amb malonil-ACP, i tornen a produir-se les etapes de reducció, deshidratació i segona reducció. Després d'un total de set cicles s'obté palmitoil-ACP, que per acció d'un enzim hidrolític dóna lloc a àcid palmític. Aquest és el principal producte de la sintasa citosòlica, encara que en menor proporció s'obté també àcid esteàric.

L'estequiometria de la síntesi de palmitat és:





## Esquema 3. Síntesi d'àcids grassos



El NADPH necessari per les etapes reductores de la síntesi procedeix de dues fonts, depenent del tipus de cèl.lula:

- En cèl.lules hepàtiques, el NADPH es forma sobre tot per acció de la **glucosa-6-fosfat deshidrogenasa**, enzim que transforma la glucosa-6-fosfat en 6-fosfogluconat

- En adipòcits, la principal font de NADPH és la reacció de descarboxilació de malat a piruvat, catalitzada per l'**enzim màlic**.

L'àcid palmític, producte principal de l'àcid gras sintasa de les cèl.lules animals, és el precursor d'altres àcids grassos de cadena més llarga, que s'obtenen pel procés d'elongació. El principal substrat per l'elongació és el palmitoil-CoA, que s'obté a partir d'àcid palmític per acció de l'**acil-CoA sintasa**. Un altre enzim microsomal, l'**acil-CoA hidrolasa**, té justament l'acció contrària: trenca el CoA éster, treient substrat per l'elongació.

En el fetge, cervell i altres teixits, hi ha dos sistemes d'elongació, un situat en el reticle endoplasmàtic ( sistema microsomal ), i l'altre en la mitocòndria ( Vance i Vance, 1985 ). Darrerament s'ha demostrat l'existència d'un sistema d'elongació peroxisòmic.

El sistema d'elongació microsomal és el més eficaç, i té lloc en quatre fases:

1. Condensació de l'acil-CoA amb malonil-CoA per formar un  $\beta$ -cetoacil-CoA. Aquesta és la reacció velocitat limitant ( Vance i col., 1985 ), i es té l'evidència que existeixen tres enzims condensants diferents, per àcids grassos saturats, monoinsaturats, i poliinsaturats ( Prasad i col., 1986 ).

2. Reducció del  $\beta$ -cetoacil-CoA a  $\beta$ -hidroxiacil-CoA

3. Deshidratació de l'alcohol secundari per formar trans-2-enoil-CoA

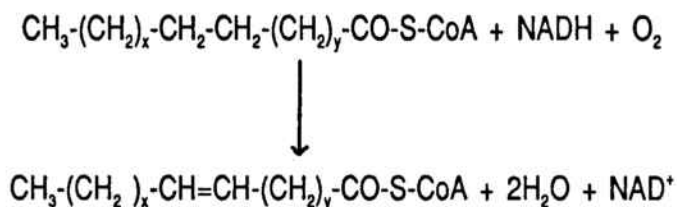
4. Segona reducció del doble enllaç en trans, obtenint-se un acil-CoA allargat en dos àtoms de carboni

Es pot observar que les etapes són molt similars a les de la síntesi "de novo", però hi ha algunes diferències:

- en les etapes reductores de l'elongació, tant NADPH com NADH poden ser utilitzats com a donadors d'electrons, en tant que en la síntesi s'utilitza exclusivament NADH

- els enzims de l'elongació actuen separatament, a diferència dels enzims de la síntesi, que constitueixen un complex multienzimàtic que no es pot separar en components individualment actius.

El sistema d'elongació microsomal està connectat amb un sistema de desaturació d'àcids grassos. En mamífers existeixen quatre desaturases diferents:  $\Delta^9$ ,  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$ , i  $\Delta^4$ , que actuen sobre diferents substrats, introduint-hi dobles enllaços segons el següent mecanisme ( Jeffcoat,1979 ):



Les quatre desaturases ténen requeriment absolut d'oxígen mol.lecular, que actúa com a acceptor de dos parells d'hidrògens, un del NADH i l'altre de l'acil-CoA ( Vance i col., 1985 ).

La desaturació en els mamífers està subjecta a una sèrie de normes:

- el primer doble enllaç en un acil-CoA saturat s'introdueix en la posició 9

- com que els sistemes animals no poden introduir dobles enllaços més enllà de la posició 9, els subsegüents dobles enllaços s'insereixen entre el ja existent i l'extrem carboxil de la cadena carbonada. En canvi, les plantes introdueixen el segon i tercer doble enllaç entre el ja existent i el grup metil terminal. Degut a això, els animals són absolutament depenents de les plantes per obtindre àcids grassos amb dobles enllaços en les posicions 12 i 15 (linoleic i  $\alpha$ -linolènic), que són precursors de prostanoids i s'anomenen àcids grassos essencials.

- en els animals superiors sempre hi ha d'haver un grup metilè entre dos dobles enllaços. Per això, cal que l'elongació alterni amb la desaturació. Així, per reaccions que alternativament introdueixen dobles enllaços i allarguen la cadena carbonada, s'obtenen els àcids grassos de les sèries n-9, n-7, n-6 i n-3.

Els electrons necessaris per les reaccions de desaturació i elongació dels àcids grassos provenen de dos sistemes transportadors d'electrons presents en la fracció microsomal hepàtica (Ilan i col., 1981; Tamura i col., 1988).

## 2. HIPERLIPOPROTEINEMIES I EL SEU TRACTAMENT

### Metabolisme de les lipoproteïnes

Els lípids es transporten en sang units a apolipoproteïnes, constituint les lipoproteïnes. L'estructura d'aquestes consta d'un nucli de triglicèrids i ésters de colesterol envoltat per una esfera de fosfolípids, colesterol lliure i proteïna ( Monk i Todd, 1987 ).

Majoritàriament hi ha quatre tipus de lipoproteïnes, que es classifiquen segons la seva densitat : quilomicrons (QM), lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL).

Els lípids ingerits amb la dieta són solubilitzats en l'intestí per les sals biliars i absorbits per les cèl.lules de la mucosa intestinal, on es formen els QM ( Perry, 1986). Aquests constitueixen la forma en que els lípids exògens són transportats des de l'intestí a la limfa i al plasma. Un cop alliberats a la circulació sistèmica, els QM són metabolitzats per la lipoproteïnlipasa (LPL) de l'endoteli vascular, de forma que la majoria dels triglicèrids que contenen són eliminats, i es formen els anomenats QM remanents ( Illingworth , 1987 ). Aquests contenen apoproteïna E, que és reconeguda per receptors hepàtics específics que s'encarreguen de la seva recaptació ( Mahley i Angelin, 1984 ).

Les VLDL són sintetitzades pel fetge, i actuen com el major transportador de triglicèrids endògens ( Illingworth, 1987 ). Les VLDL són catabolitzades, a l'igual que els QM, per la LPL, conduint a la formació de lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL). Les IDL poden interaccionar amb receptors hepàtics que reconeixen la apoproteïna E ( Illingworth, 1987 ) i ser catabolitzades, o bé convertir-se extrahepàticament en LDL, les quals constitueixen el principal transportador de colesterol ( Perry, 1986 ). El catabolisme de les LDL té lloc en les cèl.lules perifèriques i en el fetge, i és facilitat per vies mitjançades i no mitjançades per receptors. La recaptació de les LDL per receptors d'alta afinitat produeix una inhibició de la biosíntesi hepàtica de colesterol ( per inhibició de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa, degut a l'aport de colesterol ), un increment de la velocitat d'esterificació del colesterol intracel.lular i una disminució del nombre de receptors

d'alta afinitat per la LDL ( Illingworth, 1987 ). Les LDL estan constituïdes sobre tot per ésters de colesterol, i la seva funció principal és proveïr colesterol als teixits. Conseqüentment, les concentracions de LDL estan directament correlacionades amb el risc de patir malalties coronàries.

La quarta classe de lipoproteïnes són les HDL. Aquestes deriven de les HDL immadures que són secretades pel fetge i l'intestí. Alternativament, també poden formar-se a partir de les VLDL i QM, després de la hidròlisi dels triglicèrids per la LPL ( Nicoll i col., 1980 ). Durant la maduració de les HDL, el colesterol lliure de la seva superfície és esterificat amb àcids grassos per acció de la lecitín-colesterol aciltransferasa (LCAT). Aquesta reacció fa que constantment decreixi el nivell de colesterol no esterificat en el compartiment plasmàtic, i porta a un eflux de colesterol des de les superfícies cel·lulars a les HDL. Això és el que s'anomena transport revers de colesterol ( Frohlich i Pritchard, 1989 ). Les HDL actuen, doncs, com un receptacle pel colesterol, transferint-lo des dels teixits perifèrics al fetge, d'aquí la correlació inversa entre les concentracions plasmàtiques de colesterol-HDL i l'aterosclerosi i el risc de malaltia coronària ( Gordon i col., 1977).

### Classificació de les hiperlipoproteïnèmies

Fredericckson i Lee (1965), van classificar les hiperlipoproteïnèmies segons el patró electroforètic de les lipoproteïnes presents en el sèrum en nivells anormalment alts :

. Tipus I : Es caracteritza per un increment en els nivells plasmàtics de QM

. Tipus II a : S'anomena també hipercolesterolèmia familiar essencial, i es manifesta per un augment del colesterol i de les LDL, en tant que el colesterol-HDL es troba disminuït. Els nivells de triglicèrids i de VLDL són normals.

. Tipus II b : Es caracteritza per uns nivells de colesterol, LDL, triglicèrids i VLDL anormalment alts.

. Tipus III : Es caracteritza per una acumulació de IDL, possiblement per un bloqueig parcial del metabolisme de les VLDL a LDL, ràpida producció de apo B o nivells anormals de apo E. Les concentracions de triglicèrids i colesterol sèrics es troben també incrementades.

. Tipus IV : Es manifesta per nivells elevats de VLDL, amb la consegüent hipertrigliceridèmia i recíproca depressió de les HDL. El colesterol-LDL és normal, però el colesterol total pot ser alt degut a l'increment en el colesterol-VLDL.

. Tipus V També anomenada hiperlipèmia mixta familiar, es caracteritza per l'acumulació de VLDL i QM, i possiblement està causada per un defecte en el catabolisme dels triglicèrids endògens i exògens.

. Tipus VI . Les HDL es troben incrementades, en tant que els nivells de colesterol, triglicèrids, VLDL i LDL són normals.

Les formes més habituals en el nostre medi són la IIa i la IIb, sent la causa més comú la disminució en el nombre de receptors d'alta afinitat per les LDL. En altres cassos, els receptors ténen una afinitat reduïda per les LDL o ténen localitzacions que permeten la unió però no la internalització de les LDL.

La classificació de Frederickson dóna poca informació sobre l'etiologia del desordre lipídic. La American Heart Association, va suggerir una classificació etiològica ( Gotto i col., 1984 ) on es consideren tres categories:

#### 1. Hiperlipoproteïnèmies primàries (origen genètic):

- anormalitat en els receptors
- anormalitat en les apolipoproteïnes
- anormalitat enzimàtica
- deficiència d'apolipoproteïnes
- deficiència enzimàtica

## 2. Hiperlipoproteïnèmies secundàries:

- diabetis mellitus
- pancreatitis
- hipotiroidisme
- mieloma múltiple
- ingestió d'alcohol
- síndrome nefròtica
- obesitat
- embaràs
- lupus eritematosus sistèmic
- fàrmacs

## 3. Hiperlipoproteïnèmies d'origen dietètic:

- dieta rica en greix i colesterol
- obesitat

L'elevació de colesterol en sang està directament relacionada amb l'incidència de malaltia isquèmica coronària ( Perry, 1986 ). Si bé el paper del colesterol és clar, no se sap encara si la relació entre hipertrigliceridèmia i aterosclerosi és causal o casual, però les evidències són suficients per justificar la instauració de tractament ( Hawkins i col.,1987 ). En el tractament de les hiperlipoproteïnèmies s'aconsella intentar corregir l'alteració mitjançant mesures higiènic-dietètiques. Si això no és suficient, cal recórrer al tractament farmacològic. El principi actiu s'escollirà segons el tipus d'hiperlipoproteïnèmia que es vulgui corregir:



| <u>Tipus</u> | <u>1ª elecció</u>   | <u>2ª elecció</u>                        |
|--------------|---|--|
| IIa          | Resines<br>. colestiramina<br>. colestipol<br>Acid nicotínic<br>Inhib. HMGCóA RD<br>. lovastatina<br>. simvastina<br>Der. àc. clofíbric<br>. fenofíbrat<br>. bezafíbrat | Probucol<br>Gemfibrozil<br>Neomicicina   |
| IIb          | Acid nicotínic<br>Inhib. HMGCóA RD<br>. lovastatina<br>. simvastatina<br>Der. àc. clofíbric<br>. gemfibrozil<br>. fenofíbrat<br>. bezafíbrat                            | Colestiramina<br>Colestipol<br>Clofíbrat |
| III          | Acid clofíbric<br>Der. àc. clofíbric<br>. gemfibrozil<br>. fenofíbrat<br>. bezafíbrat<br>Inhib. HMGCóA RD<br>. lovastatina<br>. simvastina<br>Acid nicotínic            |  |

| <u>Tipus</u> | <u>1ª elecció</u>             | <u>2ª elecció</u>                     |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| IV           | Gemfibrozil<br>Acid nicotínic | Clofibrat<br>Bezafibrat<br>Fenofibrat |

### 3. PROLIFERADORS PEROXISOMICS

Molts dels fàrmacs hipolipemiants emprats pel tractament de les hiperlipoproteinèmies pertanyen al grup dels proliferadors peroxisòmics. Aquests són un grup de compostos estructuralment diferents que es caracteritzen perquè la seva administració a rosegadors causa un increment en el nombre de peroxisomes i una disminució en els nivells de triglicèrids plasmàtics ( Reddy i col., 1975 ). El grup de proliferadors peroxisòmics inclou no només fàrmacs hipolipemiants relacionats o no amb el clofibrat, sinó també diversos plastificants i herbicides:

- Clofibrat i anàlegs estructurals
  - . Clofibrat
  - . Bezafibrat
  - . Ciprofibrat
  - . Clobuzarit
  - . Fenofibrat
  - . Gemfibrozil
  - . Metil clofenapat
  - . Nafenopina
  - . SaH-42,348
  
- Compostos estructuralment no relacionats amb el clofibrat
  - . Acid acetilsalicílic
  - . BR-931
  - . Colestiramina
  - . Acid nicotínic
  - . Tiadenol
  - . Acid tibríc
  - . WY-14,643

- Plastificants i compostos relacionats

- . Di(2-etilhexil)ftalat
- . Di(2-etilhexil)adipat
- . Mono(2-etilhexil)ftalat
- . 2-etiletanol

- Herbicides

- . Acid 2,4-diclorofenoxiacètic
- . Acid 2,4,5-triclorofenoxiacètic
- . Acid 4-cloro-2-metilfenoxiacètic

Respostes hepàtiques a l'administració de proliferadors peroxisòmics

Les alteracions morfològiques i bioquímiques induïdes en rosegadors per l'administració de proliferadors peroxisòmics són qualitativament similars, encara que la magnitud de les alteracions hepàtiques està en relació amb la potència hipolipemiant de l'agent ( Reddy i col., 1982 b; Cohen i Grasso, 1981 ). Les respostes hepàtiques produïdes per l'administració de proliferadors peroxisòmics han estat extensament estudiades, i poden dividir-se en:

1. Hepatomegàlia

Es el creixement del fetge mesurat com un increment de la relació de pesos fetge/cos, i sembla ser una resposta característica dels animals de laboratori exposats a diversos xenobiòtics ( Reddy i Lalwani, 1983 ). L'administració crònica de clofibrat, així com d'altres agents hipolipemians, produeix una hepatomegàlia adaptativa, no patològica ( Dalton i col., 1974 ). L'hepatomegàlia és dosi-depenent i pot o no reflectir canvis ultraestructurals ( Lazarow i col., 1982).

El creixement del fetge es produeix ràpidament en resposta a l'administració de clofibrat, assoleix un estat estacionari als 10-14 dies i torna als nivells normals després de 10-14 dies de suspendre el tractament ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

L'hepatomegàlia es produeix com a resultat de la hipertròfia i la hiperplàsia ( Beckett i col., 1972 ), aquesta darrera deguda a un increment de la síntesi de DNA i de la mitosi junt a una disminució de la velocitat d'apoptosi ( Kraupp i col., 1989 ). L'increment en la síntesi de DNA i de la mitosi no representen, però, una hiperplàsia reparativa, sinó un fenomen replicatiu, donada l'absència de citotoxicitat i de necrosi hepatocel·lular ( Levine i col.,1977; Reddy i col., 1979 ).

## 2. Proliferació del reticle endoplasmàtic llis (REL)

La proliferació del REL en fetge de rata té lloc en resposta a la primera dosi de clofibrat, i reverteix quan s'atura el tractament ( Hess i col., 1965 ). Aquesta proliferació s'associa amb un increment concomitant de certs enzims microsomals, sobre tot el **citocrom P-450**. Específicament, augmenten les activitats:

- **aminopirina desmetilasa** ( Platt i Cockrill, 1969 )
- **metabolisme de testosterona** ( Salvador i col., 1970 )
- **citocrom P-452**

Aquest darrer és un isoenzim constitutiu del citocrom P-450 ( Bains i col., 1985 ). Els nivells constitutius del citocrom P-452 són aproximadament un 5% del total de citocrom P-450, però el tractament amb clofibrat eleva aquest nivell a un 45% ( Hawkins i col.,1987 ). La funció més important del citocrom P-452 és la  $\omega$  i  $\omega$ -1 hidroxilació dels àcids grassos. El clofibrat estimula la  $\omega$ -hidroxilació dels àcids grassos de cadena mitja per acció del citocrom P-452 unes 10 o 20 vegades. La magnitud i especificitat d'aquest increment suggereix que la  $\omega$ -hidroxilació juga un paper important en el catabolisme accelerat dels àcids grassos associat amb l'acció dels agents hipolipemians ( Sharma i col., 1988 ), encara que alguns autors consideren que la  $\omega$ -hidroxilació dels àcids grassos de cadena mitja és independent de l'acció hipolipemiant del clofibrat ( Reich i col., 1986 ).

Per altra banda, el tractament amb agents hipolipemians produeix una marcada depressió de les activitats dels isoenzims **citocrom P-450<sub>1</sub>**, i **citocrom P-450<sub>2</sub>** . .

La proliferació del REL s'associa també amb l'estimulació de les activitats d'altres enzims microsomals que intervenen en el metabolisme lipídic. Per exemple, l'administració de clofibrat a ratolins adults incrementa l'activitat de la **glicerofosfat aciltransferasa** unes 2-3 vegades en 24

hores. L'inducció d'aquest enzim podria explicar-se per la necessitat d'incrementar la biosíntesi de glicerolípidis com a conseqüència de la hepatomegàlia i la proliferació del REL i dels peroxisomes ( Das i col., 1983 ). La biosíntesi de lípids en el reticle endoplasmàtic s'ha d'incrementar per tal de subministrar els lípids per aquests orgànuls.

També resulten estimulades pel tractament amb clofibrat les activitats de la **estearoil-CoA desaturasa** microsomal ( Kawashima i col., 1983 ) i de la **1-acil-glicerofosforilcolina aciltransferasa** ( Kawashima i col., 1984 a ).

Respecte a la **estearoil-CoA desaturasa** s'ha comprovat que el clofibrat només l'estimula "in vivo", en tant que no resulta afectada quan el clofibrat s'addiciona al medi d'incubació de microsomes de rates no tractades. Això suggereix que no es tracta d'una estimulació directa del sistema de desaturació. Sembla ser que el tractament amb clofibrat només afecta la desaturasa terminal, sense afectar l'activitat **NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa** ni el contingut en citocrom b<sub>5</sub>.

En quant a la inducció de la **1-acil-glicerofosforilcolina aciltransferasa** ( Kawashima i col., 1984 a ), pot operar, juntament amb la de la **glicerofosfat aciltransferasa**, per incorporar l'àcid oleic produït per la **estearoil-CoA desaturasa** que ha estat estimulada, en la fosfatidilcolina.

L'anàlisi, després del tractament amb clofibrat, de la composició de la fosfatidilcolina, que és el fosfolípid més abundant de la membrana microsomal, revela una duplicació de la proporció de 18:1 i una marcada reducció de la de 18:2 ( Kawashima i col., 1984 b ).

Per altra banda, el tractament amb àcid clofibrat també incrementa el contingut en 18:1 lliure. Això implicaria un increment en l'activitat no només de la **estearoil-CoA desaturasa**, sinó també de l'**elongació** microsomal del palmitoil-CoA, doncs 18:1 es sintetitza a partir de 16:0 per l'acció concertada de l'elongació i la desaturació.

Per investigar aquesta possibilitat, Kawashima i col. ( 1984 b ) van estudiar els efectes de l'administració de clofibrat sobre l'elongació del palmitoil-CoA en microsomes hepàtics, trobant que aquesta resulta incrementada unes 2.3 vegades. L'inducció dels sistemes d'elongació i desaturació provoca un augment de la proporció relativa de 18:1 lliure i això, juntament amb l'estimulació de la **1-acil-glicerofosforilcolina aciltransferasa** i de la **1-acil-glicerofosfat aciltransferasa** provoquen el canvi detectat en la composició de la fosfatidilcolina.

En contrast amb aquests resultats, Landriscina i col. ( 1977 ) van trobar que el tractament amb clofibrat reduïa notablement l'activitat **elongasa** en els microsomes hepàtics. La raó per la discrepància entre les dades presentades per Landriscina i Kawashima pot ser el primer que utilitzen en l'assaig, que en el primer cas és acetil-CoA i en el segon palmitoil-CoA.

En un estudi anterior Landriscina i col. ( 1975 ) van descriure una important inhibició "in vitro" de la elongació microsomal per acció del clofibrat.

Altres enzims microsomals que resulten induïts per l'administració d'àcid clofibrat són l'**acil-CoA sintetasa** ( Kawashima i col. col., 1984 b), que augmenta la seva activitat unes 3 vegades sense que variï la seva especificitat de substrat, i la **NADPH-citocrom c reductasa** (Facino i Carini, 1981 ). En canvi, el tractament de rates amb una dieta contenint 0.5% p/p de clofibrat produeix una disminució de l'activitat de l'altra cadena de transport electrònic microsomal, la **NADH-citocrom c reductasa** ( Kawashima i Uy-Yu, 1989).

L'activitat de l'**acil-CoA hidrolasa** microsomal hepàtica sofreix només un petit increment després del tractament amb clofibrat, a diferència de l'**acil-CoA hidrolasa** del citosol hepàtic, que s'incrementa molt ( Kato i col., 1987 ).

### 3. Proliferació peroxisòmica

L'hepatomegàlia induïda pels proliferadors peroxisòmics en rosegadors està associada amb una hipertròfia de les cèl·lules del fetge, que és deguda principalment a un increment en el nombre de peroxisomes del citoplasma ( Reddy i Lalwani, 1983 ). La proliferació peroxisòmica està relacionada amb l'administració de compostos hipolipemians, però no amb la de agents exclusivament hipocolesterolèmics, com el probucol ( Barnard i col., 1980 ). No tots els hipolipemians són igualment efectius alhora de produir proliferació peroxisòmica. Així, el metil clofenapat, ciprofibrat, Wy-14-643, nafenopina, tiadenol, fenofibrat i àcid fibrat són molt més potents que clofibrat, bezafibrat i gemfibrozil ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

L'augment del nombre de peroxisomes comença a les 24 hores de l'administració de la primera dosi de clofibrat o qualsevol altre proliferador, assoleix un estat estacionari als 14 dies, i es manté mentre el fàrmac es continua administrant ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

La proliferació peroxisòmica no només es produeix en rosegadors, sinó que també s'ha detectat en hepatòcits humans després de tractaments prolongats amb gemfibrozil ( de la Iglesia i col. 1982 ) o clofibrat ( Hanefeld i col., 1980 ).

Els peroxisomes hepàtics són orgànuls citoplasmàtics de forma esfèrica o oval, constituïts per una membrana simple que envolta una matriu granular amb una inclusió central d'urat oxidasa ( Hawkins i col., 1987 ), la qual no apareix en els peroxisomes humans. Entre les funcions dels peroxisomes destaquen la respiració, metabolisme lipídic, producció d'energia i metabolisme oxidatiu. És de particular interès la existència d'una via de  $\beta$ -oxidació peroxisòmica que difereix notablement dels enzims de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial, per exemple en que la primera no és inhibida per KCN ( Hawkins i col., 1987 ). També es considerava que la peroxisòmica no requeria carnitina ( Lazarow, 1982 ), però treballs recents han demostrat l'existència d'una **carnitinaciltransferasa** peroxisòmica ( Ramsay i col., 1988). Les dades obtingudes per Brady i col. (1989) confirmen que la **carnitinpalmítoiltransferasa** mitocondrial i la peroxisòmica, s'indueixen concomitantment per acció de certes drogues, com clofibrat i àcid acetilsalicílic.

Lazarow (1977) va demostrar l'increment de l'activitat de la  $\beta$ -oxidació en el fetge de rates tractades amb clofibrat, àcid túbic o Wy-14,643. En els darrers 5 anys, nombrosos fàrmacs hipolipemians i ésters de ftalat s'han mostrat com a potents inductors dels enzims del sistema de  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, entre ells: **enzim bifuncional peroxisòmic** ( Lalwani i col., 1981 ), **tiolasa** ( Miyazawa i col., 1981 ), **2,4-dienoil-CoA hidrolasa** ( Dommes i col., 1981 ) , **3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa** ( Hayashi i col., 1981 ) i **acil-CoA sintetasa** ( Krisans i col., 1980 ).

La inducció de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica es troba coordinada amb la del citocrom P-452, segons el següent mecanisme ( Sharma i col., 1988 ): la inducció de la  $\omega$ -hidroxilació dels àcids grassos a través del citocrom P-452, seguida d'oxidació en el citosol, produeix un increment en la formació d'àcids grassos dicarboxílics de llarga cadena. Aquests són captats pels peroxisomes, doncs el sistema de  $\beta$ -oxidació peroxisòmic metabolitza principalment els àcids grassos de cadena molt llarga ( Christiansen, 1978 ), captació que és facilitada per la co-inducció de la carnitinaciltransferasa. En els peroxisomes, donat que la  $\beta$ -oxidació està incrementada, aquests àcids grassos s'escurcen, de forma que es facilita la seva entrada en la mitocòndria, doncs aquest orgànul no pot metabolitzar fàcilment els àcids grassos de cadena llarga.



Una altra funció dels peroxisomes és la respiració, mitjançada per cinc oxidases amb gran afinitat per l'oxigen ( a excepció de la **glicolat oxidasa** ), que generen  $H_2O_2$  com a resultat de la seva acció ( Reddy i Lalwani, 1983 ). Poc es coneix dels efectes dels proliferadors peroxisòmics sobre les activitats de la  **$\alpha$ -hidroxiacid oxidasa**, **d-aminoàcid oxidasa** i **poliamina oxidasa**. En canvi, se sap que l'activitat de la **uricasa** s'incrementa més de dues vegades en rates i/o ratolins després del tractament amb clofibrat i altres hipolipemians ( Moody i Reddy, 1978 ).

Per altra banda, la **catalasa**, enzim que s'encarrega de degradar l' $H_2O_2$  produït per aquestes oxidases, sofreix un increment de dues vegades en l'activitat específica ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

#### 4. Alteracions mitocondrials

El tractament amb diversos agents hipolipemians produeix proliferació, canvis estructurals i inducció de certs enzims en les mitocòndries ( Hawkins i col., 1987 ).

En animals tractats amb clofibrat, s'ha detectat un increment del 50 al 100% en el contingut hepàtic de mitocòndries ( Kurup i col., 1970 ), així com un marcat engrossiment d'aquestes ( Reddy i col., 1969 ).

Entre els enzims mitocondrials que resulten afectats pel tractament amb agents hipolipemians es troben els de la  **$\beta$ -oxidació**. Les dades de Eacho i Foxworthy (1988), demostren que el bezafibrat, a l'igual que altres proliferadors peroxisòmics, inhibeix la  $\beta$ -oxidació mitocondrial. Segons aquests autors, l'inducció de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica podria ser una resposta adaptativa a la inhibició d'aquest procés en la mitocòndria.

Altres autors, en canvi, suggereixen una inducció coordinada de la  $\beta$ -oxidació en peroxisomes i mitocòndries ( Brady i col., 1989 ), juntament amb la de les **carnitinpalmitoiltransferases** peroxisòmica i mitocondrial. L'increment en l'activitat de la **carnitin palmitoiltransferasa** mitocondrial és degut, en part, a un increment de la quantitat d'aquest enzim, resultat d'un augment en la velocitat de transcripció i en els nivells de  $RNA_m$  específic ( Brady i Brady, 1989 ).

Per altra banda, l'activitat de la **carnitin acetiltransferasa** mitocondrial hepàtica augmenta unes 10 vegades en rates tractades amb clofibrat, facilitant així el transport de l'acetil-CoA format extramitocondrialment a la mitocòndria ( Christiansen i col., 1978 ).

La fracció mitocondrial hepàtica d'animals tractats amb clofibrat, exhibeix una capacitat incrementada per oxidar acilcarnitines de cadena curta, en tant que l'oxidació de palmitoil i erucoil-carnitina mostra molt poca variació ( Christiansen i col., 1978 ).

Les mitocòndries de fetge de rata contenen cinc **acil-CoA deshidrogenases** FAD-depenents. D'elles, les tres que estan involucrades en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos de cadena simple ( **butiril, octanoil i palmitoil-CoA deshidrogenases** ) veuen incrementada la seva activitat un 48, 116 i 98%, respectivament, en animals tractats amb clofibrat. En canvi les activitats de la **isovaleril** i de la **isobutiril-CoA deshidrogenasa**, que actuen sobre els acil-CoA ésters de cadena ramificada, no resulten modificades ( Veitch i col., 1988 ).

També resulta afectat per l'administració de prolifera- dors peroxisòmics el procés d'**elongació** mitocondrial d'àcids grassos. Per exemple, el tractament de rates Sprague-Dawley mascle amb DEHP causa un increment de més de tres vegades en l'activitat del sistema d'elongació mitocondrial, sense que resulti afectada l'activitat **trans-2-enoil-CoA reductasa** ( Moody i Reddy, 1978 ).

Altres enzims mitocondrials induïts pel tractament amb proliferadors peroxisòmics són l'**acil-CoA hidrolasa** ( Berge i col., 1984 ), la **glicerol-1-fosfat deshidrogenasa** ( Westerfeld i col., 1968 ) i les **acil-CoA sintetases** ( Krisans i col., 1980 ).

Finalment s'ha trobat que el clofibrat inhibeix "in vitro" la **respiració** mitocondrial en dos punts: en la interacció del NADH amb la NADH-deshidrogenasa i en la del succinat amb la succinat-deshidrogenasa i amb els citocroms ( Mackerer i Haettinger, 1984 ).

### Respostes renals a l'administració de proliferadors peroxisòmics

A diferència del fetge, en el ronyó no s'observa augment ni proliferació del reticle endoplasmàtic, sinó només proliferació peroxisòmica amb el corresponent increment de l'activitat dels enzims de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica ( Hawkins i col., 1987 ). També s'ha demostrat una inducció del citocrom P-450 dels microsomes del córtex renal ( Hawkins i col., 1987 ).

### Mecanismes de proliferació peroxisòmica

S'han postulat tres possibles mecanismes:

a) Interacció de l'agent inductor i/o els seus metabòlits amb un receptor citoplasmàtic dels hepatòcits i de l'epiteli del túbul proximal de ronyó. El complex proliferador-receptor interaccionaria amb la cromatina per produir increments selectius en la transcripció de RNA<sub>m</sub> específics de les proteïnes peroxisòmiques. Un receptor per la nafenopina va ser detectat en fetge de rata ( Lalwani i col., 1983 ), i recentment ha estat semi-purificat pels mateixos autors (1986). Milton i col.(1988), en canvi, han demostrat la impossibilitat de detectar cap unió específica del fàrmac als homogenats hepàtics, posant en dubte l'existència de tal receptor. Es possible que l'efecte observat no sigui degut a la formació d'un complex receptor-ligand, sinó a la unió del ligand a altres proteïnes cel·lulars, entre elles albúmina ( Milton i col., 1988 ), glutation-S-transferasa ( Awasthi i col., 1984 ) i proteïnes transportadores d'àcids grassos (fatty acid binding proteins).

b) L'influx d'àcids grassos en el fetge com a resultat del tractament amb proliferadors peroxisòmics provoca una sobrecàrrega de substrat que fa que es dispari la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica ( Reddy i Lalwani, 1983 ). Cal tenir en compte, però, que a baixes dosis de bezafibrat es produeix una inducció de la  $\beta$ -oxidació sense que existeixi proliferació peroxisòmica ( Beckett i col., 1972 ).

c) Els agents hipolipemians i/o els seus metabòlits, donada la similitud de les seves propietats fisicoquímiques amb les dels àcids grassos ( $C_{16}$  - $C_{18}$ ), poden actuar com a substrats de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, iniciant una inducció enzimàtica com a resultat d'una sobrecàrrega de substrat ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

### Mecanismes de hipolipidèmia

Si bé està clar que el tractament amb agents hipolipemians altera profundament el metabolisme lipídic, la relació entre aquests canvis i l'efecte hipolipidèmic no es coneix amb exactitud. Entre els mecanismes proposats per l'acció hipolipemiant estan els següents:

1. La inducció del citocrom P-452, amb el consegüent increment de la  $\omega$  i  $\omega$ -1 hidroxilació dels àcids grassos, pot resultar inhibidora per la síntesi de triglicèrids, doncs totes dues vies competeixen pel mateix substrat, produint així l'efecte hipolipemiant ( Hawkins i col., 1987 ).

2. La inducció dels enzims de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial és, probablement, la major contribució a l'efecte hipolipemiant ( Hawkins i col., 1987 ), juntament amb l'increment de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, encara que aquesta darrera només contribueix en un 10% a la oxidació total dels àcids grassos ( Mannaerts i col., 1979 ).

3. Efecte sobre les lipoproteïnes i el colesterol plasmàtics:

a) Redueixen els nivells de VLDL, per una banda disminuint la seva síntesi al reduir els nivells d'àcids grassos lliures ( Carlson i Olsson, 1979 ), però sobre tot incrementant el catabolisme de les VLDL a través de la inducció de la LPL .

b) Inhibeixen la hidroximetilglutarilCoA reductasa ( Berndt i col., 1978 ), tant "in vivo" com "in vitro" . La inhibició en el cas de l'àcid clofíbric i derivats és no competitiva ( Sheppherd i Packard, 1988 ). La disminució del contingut en colesterol en la cèl.lula produeix un increment del nombre de receptors d'alta afinitat per la LDL ( Goldstein i Brown, 1983 ). El resultat final de la inhibició de la colesterogènesi seria, doncs, un increment en la recaptació i degradació de les LDL ( Stewart i col., 1982 ). Així, el fàrmac produeix un increment dels receptors en tots els subjectes, sense tindre en compte el valor inicial de triglicèrids, suggerint que aquest mecanisme

no és responsable de la variabilitat d'efecte del fàrmac segons el tipus de hiperlipidèmia (en el tipus IIa es redueixen els nivells de LDL, en tant que en el tipus IV, la tendència és a augmentar els nivells de LDL-colesterol). Aquesta variabilitat d'efecte pot ser que derivi de l'acció del fàrmac sobre la producció de LDL ( Stewart i col., 1982 ), possiblement per una estimulació de la LPL que augmentaria el flux de apoproteïna B en la LDL ( Klose i col., 1980 ).

4. S'ha postulat que la reducció de triglicèrids sèrics que s'observa amb aquests compostos és deguda al desplaçament de la tiroxina de les seves proteïnes d'unió per acció del clofibrat. Això resulta en un efecte de hipertiroidisme en el fetge i de hipotiroidisme en altres òrgans ( Ruegamer i col., 1969 ), però el paper de la tiroxina en la hiperlipidèmia observada no es coneix amb exactitud ( Hawkins i col., 1987 ).

S'ha descrit que en rates tractades amb clofibrat, bezafibrat, gemfibrozil i nafenopina, l'efecte hipolipemiant no és dosi-depenent, i no es correlaciona amb la proliferació peroxisòmica, fet que implicaria un menor paper dels peroxisomes en el mode d'acció dels agents hipolipemiant ( Stegmeier i col., 1982 ), de forma que la proliferació peroxisòmica seria un efecte secundari amb una contribució mínima a l'acció farmacològica ( Hawkins i col., 1987 ).

### Carcinogènesi

El desenvolupament de tumors hepàtics en animals tractats amb diversos proliferadors peroxisòmics mostra que aquests són carcinògens, almenys en rosegadors ( Reddy i col., 1980 ).

#### 1. Tests de carcinogènesi a curt plaç

Es tracta de tests de mutagènesi, on s'assaja l'habilitat d'un compost per causar danys al DNA, assumint que aquests danys condueixen a la mutació i subsegüent transformació maligna ( Bridges, 1980 ). Aquests tests han resultat negatius en la majoria de proliferadors peroxisòmics: clofibrat, nafenopina, àcid tìbric, Wy-14,643, SaH-42,348, BR-931 ( Warren i col., 1980 ), gemfibrozil ( Fitzgerald i col., 1981 ), metil clofenapat i bezafibrat ( Reddy i col., 1982 a), MEHP i DEHP ( Thomas i Thomas, 1984 ).

## 2. Testos de carcinogènesi a llarg plaç

L'administració de clofibrat en la dieta a una concentració del 0.5% p/p durant 28 mesos provoca el desenvolupament de carcinomes hepatocel.lulars en un 91% dels animals tractats ( Reddy i Qureshi, 1979 ). També l'administració de nafenopina a ratolins produeix una incidència del 100% de carcinomes hepatocel.lulars desenvolupats entre 18 i 20 mesos de tractament ( Reddy i col., 1976 ).

El tractament amb bezafibrat en concentracions efectives en disminuir els triglicèrids sèrics, no incrementa la incidència de tumors hepàtics en rates ( Fahimi i col., 1982), però a dosis substancialment més altes, sí ( Hartig i col., 1982 ).

Altres agents hipolipemians confirmats com a tumorogènics són: àcid fíbric ( Reddy i col., 1980 ), gemfibrozil ( Fitzgerald i col., 1981 ), Wy-14,643 ( Reddy i col.,1979), BR-931 ( Reddy i col., 1980 ) i plastificants com DEHP i DEHA ( Reddy i Lalwani, 1983 ).

## 3. Possibles mecanismes d'hepatocarcinogènesi

Les fases crítiques del procés de carcinogènesi són la iniciació i la promoció. Els agents iniciadors actuen per interacció directa amb el DNA, en tant que els promotors són agents no mutagènics per sí mateixos, però causen formació de tumors quan són administrats després de la iniciació.

Tots els agents hipolipemians assajats produeixen tumors hepàtics en rosegadors després d'un tractament prolongat a altes dosis, però no ténen capacitat per produir danys en el DNA, per tant es consideren carcinògens epigenètics ( Hawkins i col., 1987 ). Sembla ser, doncs, que aquests agents no causen iniciació, sinó que actuen com a promotors ( Kraupp i col., 1989 ) sobre cèl.lules alterades per mutació espontània o anormalitats genètiques heredades ( Williams i col., 1981 ). També és possible que aquests agents provoquin la iniciació per un procés inicial no genètic, o bé que el procés inicial genotòxic no sigui detectat per la insuficient sensibilitat dels tests emprats ( Hawkins i col., 1987 ).

S'ha proposat que la carcinogènesi produïda per aquests agents pot estar relacionada amb l'increment de la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, que duu a una excessiva producció de  $H_2O_2$ . En condicions normals les glutatión-S-transferases donen protecció en front dels hidroperòxids, però s'ha demostrat que el clofibrat inhibeix forta i irreversiblement aquests enzims ( Awasthi col., 1984 ), quedant la cèl.lula desprotegida en front del  $H_2O_2$ , que pot ser el responsable de l'efecte iniciador ( Hawkins i col., 1987 ).

En conclusió: els agents hipolipemians semblen posseir activitats iniciadores i promotores de tumors, i és possible que l'efecte iniciador resulti d'una combinació d'efectes no mutagènics i d'un efecte mutagènic encara no clarament definit que és mitjançat per l'acció indirecta d'aquests agents.

#### 4. Risc potencial en humans

A pesar que l'extrapolació de les dades obtingudes en animals al risc potencial humà és rarament satisfactòria, molts dels fàrmacs hipolipemians esmentats poden representar un risc potencial de carcinogènesi en humans. En aquest cas, cal considerar la relació entre el risc de mortalitat cardiovascular i el de desenvolupar càncer.



## 4. CLOFIBRAT I ANALEGS ESTRUCTURALS

### a) Clofibrat

El clofibrat (etil 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropionat), va ser comercialitzat per primera vegada l'any 1962, i està reconegut com un fàrmac hipolipemiant força efectiu. La llarga experiència terapèutica ha convertit el clofibrat en un fàrmac de referència per la comparació amb altres agents hipolipemiants.

#### . Estudi farmacocinètic

##### - Absorció:

L'absorció del fàrmac és virtualment completa en l'home ( Cayen, 1985 ), segons un procés de primer ordre ( Chasseaud i col., 1974 ), sent de 3-6 hores el temps que es tarda en assolir la concentració màxima plasmàtica ( Houin i col., 1975 ). L'absorció és, doncs, completa però relativament lenta. Un cop absorbit, el fàrmac és ràpidament hidrolitzat per les esterases sèriques i tissulars a àcid clofíbric, que és la forma farmacològicament activa del clofibrat ( Thorp, 1962 ).

##### - Nivells plasmàtics:

La vida mitja del clofibrat en el plasma humà és de 14 a 18 hores ( Sedaghat i col., 1974). Els nivells plasmàtics s'incrementen linealment amb la dosi, i van de 35 µg/ml després d'una dosi de 500 mg ( Houin i col., 1975 ) a 160-200 µg/ml després d'una dosi de 2000 mg ( Gugler i Hartlapp, 1978 ).

##### - Unió a proteïnes:

El clofibrat s'uneix molt a les proteïnes. El percentatge d'àcid clofíbric lliure és només d'un 3% en l'home i d'un 25% en la rata ( Cayen i col., 1981 ). Gugler i Hartlapp (1978), van trobar que l'unió a les proteïnes varia amb la concentració plasmàtica de clofibrat, mantenint-se al voltant del 98% a 50 µg/ml i decreixent al 92% quan la concentració s'incrementa a 300 µg/ml.



El clofibrat desplaça a la tiroxina dels seus llocs d'unió a l'albumina ( Thorp, 1972 ), provocant un increment en la concentració de tiroxina en el fetge. Malgrat que aquest efecte hipertíroid incrementaria el catabolisme lipídic, sembla que no té relació amb l'activitat hipolipemiant del fàrmac ( Nazareth i col., 1974 ).

L'àcid clofíbric també competeix amb els àcids grassos lliures per la seva unió a l'albumina ( Thorp, 1972 ), i s'ha suggerit que la disponibilitat d'aquests per la síntesi de triglicèrids es troba així reduïda ( Barret, 1969 ). El desplaçament dels àcids grassos lliures per acció del clofibrat és més pronunciat quant més llarga és la cadena de l'àcid gras ( Meisner, 1977 ).

A pesar de tot l'esmentat, sembla que el principal paper de la unió del clofibrat a les proteïnes és regular el seu transport per l'organisme, i no té res a veure amb l'acció hipolipemiant.

#### - Distribució:

El volum de distribució total del clofibrat en l'home és petit, entre 5 i 9 l ( Houin i col., 1975; Gugler, 1978 ). L'extensiva unió del fàrmac a les proteïnes limita la seva distribució en els teixits, encara que un 5% de la dosi es troba present en el fetge després de tres hores de l'administració ( Cayen i col., 1977 ).

#### - Biotransformació i excreció:

En l'home l'àcid clofíbric s'excreta sobre tot per l'orina ( Houin i col., 1975 ), i com que gairebé no sofreix metabolisme de fase 1, s'elimina principalment sense transformar o bé com a conjugat. Entre un 60% ( Houin i col., 1965 ) i un 95% ( Caldwell i Emudianuglie, 1979 ) de l'àcid clofíbric urinari està conjugat, principalment com a glucurònid.

### **Mecanisme d'acció**

El mecanisme d'acció del clofibrat a nivell cel.lular no és ben conegut. Se sap que incrementa el catabolisme de les VLDL degut a una estimulació de la LPL ( Taylor i col., 1977; Kudchodker i col., 1984 ), però no es coneix el motiu d'aquesta actuació. Petites reduccions en la síntesi i/o secreció de les VLDL poden tenir lloc, però el fàrmac no és gaire efectiu en aquest aspecte ( Perry, 1986 ). L'efecte hipocolesterolèmic del clofibrat és moderat i variable.

Altres efectes són:

- interferència amb l'unió dels àcids grassos lliures a l'albumina
- inhibició no competitiva de la biosíntesi de colesterol
- alteració del metabolisme de certes apolipoproteïnes
- increment de l'excreció fecal d'esterols neutres

### Us clínic

El clofibrat és el fàrmac d'elecció pel tractament de pacients amb hiperlipoproteïnèmia tipus III, en els quals provoca una reducció del colesterol i triglicèrids plasmàtics del 50 al 80%, i condueix a la regressió dels xantomes ( Illingworth, 1987 ).

Quan s'administra a pacients amb hipertrigliceridèmia primària, provoca una disminució de més del 75% en els nivells de colesterol i triglicèrids plasmàtics, però freqüentment produeix increments en les concentracions de LDL-colesterol ( Wilson i Lee, 1972 ),

El clofibrat és inefectiu en pacients amb hipercolesterolèmia primària i molt poc en les malalties associades amb increments del colesterol-LDL ( Illingworth, 1987 ).

Si bé els homozigots tipus II i els heterozigots tipus IIa no responen a la teràpia amb clofibrat, el fàrmac es considera de segona elecció en els heterozigots tipus IIb, en els que les VLDL es troben incrementades.

El clofibrat és rarament prescrit per altres dislipèmies que no siguin la tipus III, degut a la alta incidència de colelitiasis i de tumors malignes de colon que produeix ( Dujovne i Harris ,1989).

## b) Bezafibrat

El bezafibrat és l'àcid 2-(4-(2-(4-clorobenzamido)etil)fenoxi)-2-metilpropioníc, fàrmac hipolipemiant relacionat estructuralment amb el clofibrat.

### **Estudi farmacocinètic**

#### - Absorció i nivells plasmàtics:

Els estudis amb dosi única han demostrat una quasi completa absorció després de l'administració oral; un 100% de la dosi administrada és excretada en un plaç de 48 hores ( Monk i Todd, 1987 ).

En comparació amb el clofibrat, el bezafibrat és més ràpidament absorbit, però produeix concentracions plasmàtiques més baixes en l'estat estacionari. Això s'explica per l'aclariment més ràpid i l'absència d'acumulació del bezafibrat.

#### - Distribució:

Es disposa de poca informació sobre el volum de distribució del bezafibrat, que es calcula en uns 17 l (Abshagen i col., 1980 ). A l'igual que el clofibrat, s'uneix en gran proporció a ales proteïnes plasmàtiques: 94-96% ( Monk i Todd, 1987 ).

#### - Biotransformació i excreció:

L'eliminació del bezafibrat de l'organisme té lloc ràpidament. Un 43% de la dosi administrada s'excreta com a tal en l'orina, un 22% s'excreta com a glucurònid, i el 22% restant com a altres metabòlits, incloent el derivat hidroxilat. L'aclariment renal és de gran importància per l'eliminació de bezafibrat, i es calcula en uns 6 l/h ( Abshagen i col., 1979 ).

## Mecanisme d'acció

El mecanisme d'acció del bezafibrat no es coneix amb exactitud. El fàrmac provoca diferents efectes en els enzims involucrats en el metabolisme de lípids i de lipoproteïnes, però no està clar quins d'aquests efectes involucren una acció directa del bezafibrat.

Entre els efectes sobre voluntaris sans, es pot destacar que el bezafibrat redueix les concentracions de triglicèrids i colesterol total en sèrum ( Oster i col., 1985 ), augmenta la concentració de colesterol-HDL i redueix la de colesterol-LDL. En malalts hiperlipidèmics el fàrmac té un efecte variable sobre la concentració de colesterol-LDL, depenent del perfil lipoproteic abans del tractament ( Gavish i col., 1986 ). En aquests malalts, la reducció dels triglicèrids va associada a una marcada reducció de les VLDL, doncs el catabolisme d'aquestes es veu incrementat degut a la estimulació de la LPL ( Shepherd i col., 1984 ). De totes formes, no està clar si aquest és un efecte directe del bezafibrat o subsegüent a canvis induïts per aquest en els components proteics de les lipoproteïnes. En concret, s'ha descrit que el bezafibrat produeix un increment en la concentració de la apoproteïna cII, que activa la LPL, però no en la de la apoproteïna cIII, que inhibeix aquest enzim ( Monk i Todd, 1987 ).

En estudis amb animals, s'ha vist que el bezafibrat inhibeix la hidroximetilglutaril-CoA reductasa ( Berndt i col., 1978 ) i la ACAT ( Hudson i Day, 1982 ), però aquests fets no s'han confirmat en l'home. De totes formes, és possible que la síntesi de colesterol estigui inhibida, doncs s'ha vist que el bezafibrat incrementa l'activitat del receptor de les LDL en pacients amb hiperlipoproteïnèmia tipus II ( Stewart i col., 1982 ), activitat que depèn de la concentració intracel·lular de colesterol. Això pot produir la reducció del colesterol-LDL que s'observa en aquest tipus de malalts.

En canvi, en la hiperlipoproteïnèmia tipus IV, els nivells de colesterol-LDL poden veure's incrementats per la teràpia amb bezafibrat.

## Us clínic

El bezafibrat s'utilitza principalment per tractar anormalitats lipídiques en malalts amb hiperlipoproteïnèmia tipus IIa, IIb i IV. En aquests cassos, el fàrmac actua reduïnt les concentracions de colesterol i triglicèrids plasmàtics. El colesterol-HDL és incrementat en tots els tipus d'hiperlipidèmia, però sembla que l'efecte és més gran quant més baixa és la concentració

inicial d'aquesta lipoproteïna; per això pot tenir valor terapèutic en pacients amb deficiència en HDL.

Les reaccions adverses del bezafibrat són, en general, benignes: les més freqüents són alteracions gastrointestinals i reaccions cutànies ( Monk i Todd, 1987 ). També pot incrementar la litogènesi biliar, encara que la incidència sembla ser molt més reduïda que en el tractament amb clofibrat.

### c) Gemfibrozil

El gemfibrozil és un àcid fenoxipentanoic no halogenat, en concret és l'àcid 5-(2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoic, estructuralment diferent de clofibrat i bezafibrat, però que es classifica dins el grup dels derivats de l'àcid fibríc.

#### **Estudi farmacocinètic**

##### - Absorció:

Després de l'administració oral de gemfibrozil, l'absorció és ràpida i completa ( Todd i Ward, 1988 ). La concentració del fàrmac en el plasma és directament proporcional a la dosi, i tendeix a augmentar amb les administracions repetides, encara que l'estat estacionari s'assoleix entre 7 i 14 dies ( Smith, 1976 ). Després de l'administració de 600 mg de gemfibrozil 3 cops al dia, les concentracions màximes del fàrmac en plasma estan entre 15 i 25 mg/l ( Okerholm i col., 1976).

##### - Distribució:

En rates, les concentracions plasmàtiques del fàrmac només són excedides per les dels òrgans involucrats en el metabolisme i l'excreció: fetge i ronyó ( Todd i Ward, 1988 ). "In vitro", el gemfibrozil s'uneix a l'albumina humana en un 87-98% a concentracions terapèutiques ( Anònim, 1982 ).

- Metabolisme i excreció:

El gemfibrozil es metabolitza per hidroxilació donant quatre metabòlits diferents, dels quals el més abundant és el que resulta de la carboxilació de l'anell benzènic. Tots els metabòlits i el fàrmac no metabolitzat es conjuguen amb àcid glucurònic. Només el derivat àcid benzoic s'excreta en quantitats apreciables sense conjuguar ( Okerholm i col.,1976 ).

L'excreció es realitza sobre tot per l'orina ( Todd i Ward, 1988 ); s'ha descrit l'existència de cicles enterohepàtics en animals d'experimentació ( Okerholm i col., 1976).

**Mecanisme d'acció**

En varies espècies animals, el gemfibrozil redueix les concentracions plasmàtiques de triglicèrids ( Dvornik i Cayen, 1980 ), resultant un ordre de magnitud més potent que el clofibrat. El colesterol total plasmàtic no resulta afectat per l'administració del fàrmac ( Dvornik i Cayen, 1980 ), excepte en animals alimentats amb dietes riques en colesterol ( Krause i Newton, 1985).

En subjectes normolipidèmics, el gemfibrozil provoca disminució de les concentracions de triglicèrids i colesterol total i increment del colesterol-HDL ( Agustín i Gnasso, 1985 ).

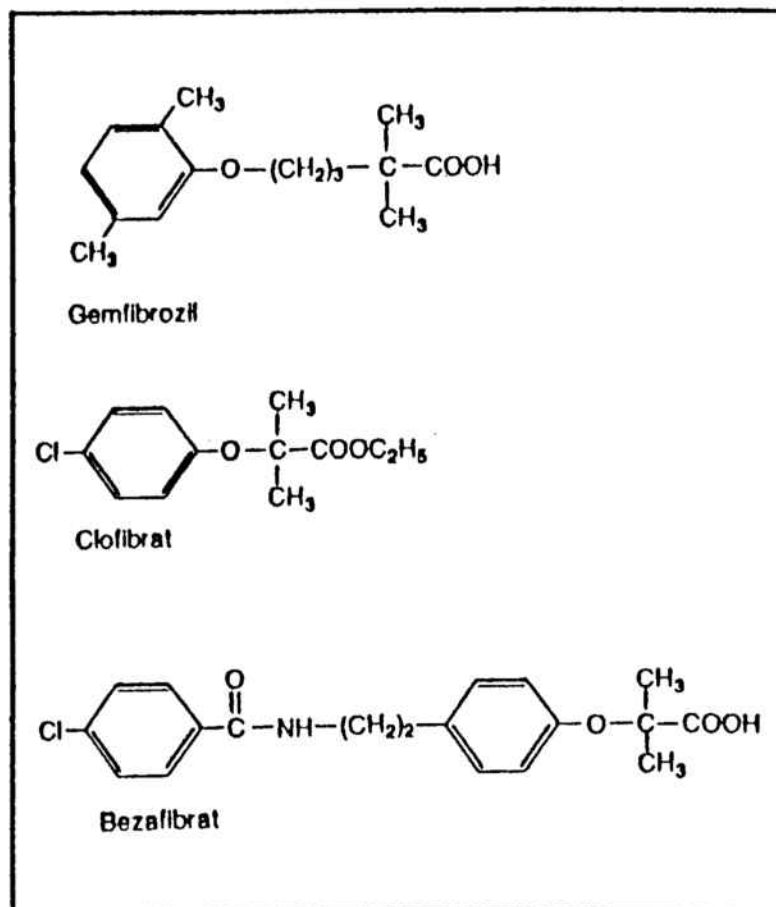
El mecanisme pel qual el gemfibrozil realitza aquestes accions no està clarament elucidat, però se sap que, a diferència del clofibrat, inhibeix la formació de triglicèrids, reduïnt així la producció de VLDL en el fetge ( Keseaniemi i Grundy, 1984 ).

Per altra banda, també potencia l'activitat LPL, incrementant així el catabolisme de les VLDL. L'efecte sobre les LDL és variable, i les concentracions de HDL resulten incrementades ( Keseaniemi i Grundy, 1984 ).

A diferència del clofibrat, s'ha demostrat que el gemfibrozil estimula marcadament la hidroximetilglutaril-CoA reductasa en rates ( Newton, 1985 ), de forma que un efecte directe del gemfibrozil sobre els triglicèrids hepàtics i el metabolisme del colesterol sembla ser el mecanisme d'acció més plausible ( Todd i Ward, 1988 ).

## Us clínic

En estudis clínics realitzats, el gemfibrozil ha mostrat ser efectiu en la disminució dels nivells de triglicèrids i VLDL en malalts amb hiperlipoproteïnèmies tipus II i IV ( Keseaniemi i Grundy, 1984 ). De fet, és ben tolerat i molt efectiu com a fàrmac de primera elecció en tots els tipus de dislipèmies caracteritzades per hipertrigliceridèmia, excepte en el tipus I ( Todd i Ward, 1988 ).



Estructura química de clofibrat, bezafibrat i gemfibrozil

## 5. CADENES DE TRANSPORT ELECTRONIC MICROSOMAL

El reticle endoplasmàtic dels hepatòcits conté almenys dues cadenes de transport electrònic, cadascuna d'elles constituïda per una flavoproteïna i un citocrom ( Nagi i col., 1983 ; Ilan i col., 1981 ).

El primer d'aquests sistemes inclou una flavoproteïna depenent de NADH anomenada **NADH-citocrom  $b_5$  reductasa**, la qual transfereix els equivalents reductors des del NADH fins al citocrom  $b_5$ . A través d'aquest arriben també equivalents reductors al citocrom P-450, de forma que la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa intervé no només en el metabolisme lipídic sinó també en el metabolisme d'alguns fàrmacs.

El segon sistema conté una flavoproteïna NADPH-depenent anomenada **NADPH-citocrom P-450 (citocrom c) reductasa**, capaç de transferir electrons al citocrom P-450 i al citocrom  $b_5$ , així com a l'acceptor artificial, citocrom c. També el citocrom  $b_5$  pot transferir electrons al citocrom P-450.

La molècula de la NADPH-citocrom P-450 reductasa és força complexa. Conté quatre dominis amb diferents funcions: segment d'unió a la membrana (I), domini d'unió al FMN (II), lloc d'unió pel FAD (III) i domini d'unió pel NADPH (IV). Sembla ser que el domini II és el centre actiu per la interacció amb els acceptors d'electrons: citocrom P-450, citocrom  $b_5$  i citocrom c ( Nisimoto i Ostuka-Murakami, 1988 ).

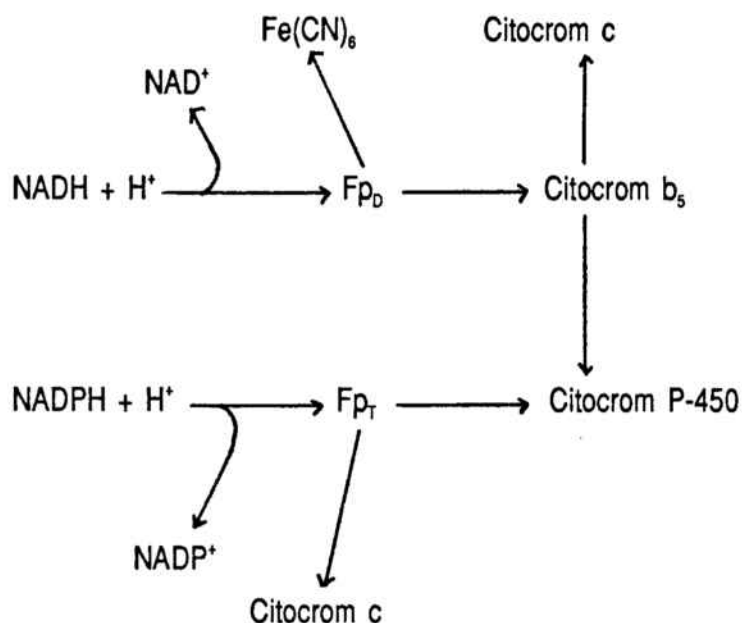
A diferència de la NADPH-citocrom P-450 reductasa, que utilitza dos cofactors, la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa només utilitza FAD com a cofactor.

El que s'anomena **NADH-citocrom c reductasa** no és un sol enzim, sinó que representa la transferència d'electrons des del NADH a la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa , d'aquesta al citocrom  $b_5$  i finalment a l'acceptor artificial, citocrom c.

En el següent esquema s'indiquen les vies de transport electrònic microsomal, incloent-hi els acceptors artificials:



Esquema 4. Sistemes de transport electrònic  
microsomal



El citocrom b<sub>5</sub> juga un paper central com a portador microsomal d'electrons, que interactua amb dues reductases diferents i transfereix electrons a moltes reaccions fisiològiques:

- desaturació d'àcids grassos: El complex desaturasa consta de tres proteïnes: NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa, citocrom b<sub>5</sub> i una desaturasa terminal. La transferència d'electrons des del NADH fins la desaturasa requereix una associació de les tres proteïnes del complex en la membrana microsomal ( Jeffcoat, 1979 ).

- elongació d'àcids grassos

- oxidacions mixtes catalitzades pel citocrom P-450, destacant específicament la w i w-1 hidroxilació dels àcids grassos, catalitzada per un isoenzim (citocrom P-452), que s'indueix a l'administrar proliferadors peroxisòmics, com ja s'ha comentat en el capítol 3 d'aquesta part teòrica.

- reducció de la metahemoglobina
- reducció de les N-hidroxilamines
- síntesi de colesterol
- desaturació dels fosfolípids
- síntesi de plasmalògen
- desmetilació de 4-metilesterols

Cal destacar que de totes aquestes funcions, sis d'elles estan relacionades amb el metabolisme lipídic.

La implicació del citocrom  $b_5$  en la transferència d'equivalents reductors al sistema d'elongació microsomal va ser establerta per Keyes i col. (1979), i en un estudi posterior ( Nagi i col., 1983 ) es va establir que el lloc de participació del citocrom  $b_5$  en aquest procés és en la primera etapa reductora de la elongació, catalitzada per la  **$\beta$ -cetoacil-CoA reductasa**, en tant que en la segona reducció, catalitzada per la **trans-2-enoil-CoA reductasa** no hi intervé el citocrom  $b_5$ . Els electrons procedents del NADPH poden arribar al sistema d'elongació a través de la **NADPH-citocrom P-450 reductasa**, però el citocrom P-450 no està involucrat en aquesta transferència ( Ilan i col., 1981).

La interacció entre el grup hemo del citocrom  $b_5$  i la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa es produeix per complementarietat de càrregues involucrant grups lisil de la reductasa i grups carboxil del citocrom ( Dailey i Strittmatter, 1980 ). El segment del citocrom  $b_5$  que l'uneix a la membrana microsomal no es requereix per aquesta transferència, i serveix només per mantindre el citocrom en una orientació òptima per la interacció catalítica.

En canvi, per la interacció del citocrom  $b_5$  amb la estearoil-CoA desaturasa o la NADPH-citocrom P-450 reductasa es requereix tota la molècula, inclòs el segment unit a membrana.

Qualitativament, els mateixos grups carboxil (Glu 47,48 i 52, i un grup propionat del segment hemo) són essencials per la interacció del citocrom  $b_5$  amb les dues reductases i amb la desaturasa ( Dailey i Strittmatter, 1980 ). A diferència del citocrom  $b_5$ , el citocrom c interacciona a través de càrregues positives que envolten l'extrem del grup hemo.

Donat que la NADPH-citocrom P-450 reductasa és capaç d'interaccionar amb tots dos citocroms, s'ha suggerit que aquesta reductasa posseeix dos dominis que permetin alternativament la interacció amb les càrregues negatives del citocrom  $b_5$  i amb les positives del citocrom c.

El fet que la mateixa superfície del citocrom  $b_5$  pugui interaccionar ràpidament amb tants enzims diferents suporta la idea de que aquestes proteïnes es troben distribuïdes a l'atzar en la bicapa fosfolipídica i que les interaccions entre elles depenen de la difusió rotacional i translacional en aquesta bicapa ( Dailey i Strittmatter, 1980 ).

## 6. ACIL-CoA HIDROLASA

Les acil-CoA hidrolases són enzims àmpliament distribuïts en diferents òrgans de diverses espècies animals. Catalitzen la hidròlisi dels tioèsters dels àcids grassos de cadena llarga ( $C_7$ - $C_{18}$ ) ( Berge i col., 1981 ), presentant màxima activitat pel palmitoil-CoA; per això de vegades reben el nom trivial de palmitoil-CoA hidrolasa . Així, doncs, juguen un paper molt important en el control de la síntesi d'àcids grassos, que utilitza acil-CoAs com a substrats, i de la longitud d'aquests àcids grassos sintetitzats ( Berge, 1979 ).

En el fetge existeixen 3 acil-CoA hidrolases diferents, localitzades en els microsomes, la matriu mitocondrial i el citosol.

L'acil-CoA hidrolasa microsomal ha estat purificada: és un monòmer de PM 59000 D, associat a membrana, no integral, caracteritzat per la presència de tres grups sulfhidril, un dels quals està exposat al medi i sembla essencial per l'activitat enzimàtica. Els residus de cisteïna són essencials per mantindre la conformació activa de l'enzim, en tant que els de serina semblen formar part del centre actiu ( Berge, 1980 ).

Berge i col., han purificat també l'acil-CoA hidrolasa de la matriu mitocondrial dels hepatòcits, que té un pes molecular de 19000 D i presenta propietats diferents de la microsomal respecte a inactivació tèrmica, efecte de cations i anions,  $K_m$  pel palmitoil-CoA i inactivació per grups sulfhidril ( Berge, 1980 ).

L'acil-CoA hidrolasa del citosol hepàtic té una activitat molt baixa en condicions normals (0.01 unitats/mg de proteïna), però el tractament de l'animal amb clofibrat provoca un gran increment en aquesta activitat ( Kato i col., 1987 ). Aquest increment és degut a la inducció de dues noves acil-CoA hidrolases I i II, que són diferents de les hidrolases mitocondrial i microsomal ( Miyazawa i col., 1981 ). També són diferents entre elles: els seus pesos moleculars són 72000 i 40000 D respectivament, i en tant que la inducció de la hidrolasa I depen de l'estat d'andrògens de l'animal, la hidrolasa II no respon a canvis en l'estat hormonal ( Kawashima i col., 1982 ).

En contrast, les acil-CoA hidrolases de testicles i de cervell, no resulten induïdes pel tractament amb àcid clofíbric, però les activitats d'aquests enzims són de per sí molt altes en rates control ( Kato i col., 1987 ).

Es interessant el fet que les propietats de l'acil-CoA hidrolasa I del citosol hepàtic són molt similars en quant a pes molecular, cinètica i estabilitat tèrmica a les de l'acil-CoA hidrolasa del citosol de cervell i de testicles ( Kato i col., 1987 ).

L'administració d'àcid clofíbric indueix també en el citosol hepàtic dels animals tractats una tioesterasa amb capacitat per hidrolitzar el clofibril-CoA. L'activitat clofibril-CoA hidrolasa no és deguda a la palmitoil-CoA hidrolasa, sinó a un enzim específic que actua com un mecanisme per evitar la excessiva acilació del CoA-SH cel.lular ( Berge i col., 1987 ).

La cinètica de l'acil-CoA hidrolasa, així com la d'altres enzims que utilitzen lípids amfífils com a substrat és força complexa, doncs aquests espontàniament formen micelles quan es troben en un medi de reacció aquós per sobre de l'anomenada concentració micel.lar crítica (CMC), fet que les corbes cinètiques es desviïn del model cinètic de Michaelis i Menten ( Gatt i Bartfai, 1977 ).

Per l'acil-CoA hidrolasa només els monòmers de palmitoil-CoA lliure, la concentració dels quals és essencialment constant quan es supera la CMC, actuen com a substrats, en tant que les formes micel.lars són inhibidores ( Berge i col., 1987 ).

Per sota la CMC del palmitoil-CoA, l'enzim presenta comportament michaelià. Per això, molts cops l'addició de BSA possibilita l'ajust dels resultats al model de Michaelis i Menten, doncs l'albumina provoca un augment de la CMC, de forma que permet treballar amb concentracions elevades de palmitoil-CoA sense que es formen micelles.

En presència de BSA l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa augmenta, doncs, absorbint part del substrat, l'albumina provoca una disminució de la concentració de micelles inhibidores. A una concentració òptima d'albumina, les micelles desapareixerien, però a l'excedir aquesta concentració, inclús els monòmers serien absorbits, el que conduiria a velocitats de reacció més baixes ( Gatt i Bartfai, 1977 ).

A l'augmentar la concentració de palmitoil-CoA, es requereixen concentracions més altes de BSA per assolir l'activitat màxima. Per tant l'activació de l'enzim per la BSA depèn de la relació de concentracions Palmitoil-CoA/BSA. El màxim d'activitat per l'acil-CoA hidrolasa microsomal es troba a 120 nmol Palmitoil-CoA/mg de proteïna (BSA + proteïna enzimàtica) ( Berge, 1979 ).

Un problema addicional es presenta quan no es treballa amb enzim purificat sinó amb preparacions (suspensions de microsomes o de mitocòndries) que contenen altres constituents lipídics o proteics, els quals poden interaccionar amb el substrat ( Gatt i Bartfai, 1977 ).

Pauly i MacMillin (1988) van realitzar un estudi sobre la influència de l'albumina en la cinètica de la carnitinpalmoiltransferasa, enzim situat en la membrana mitocondrial. Aquests autors van trobar que a concentracions fixes d'albumina, les corbes velocitat/substrat eren sigmoidees. La sigmoïdicitat s'explica pel fet que l'albumina té 5 o 6 llocs d'alta afinitat pel substrat, que a molt baixes concentracions d'aquest competeixen efectivament amb l'enzim. Només quan aquests llocs estan saturats, el substrat es fa accessible a l'enzim. En canvi, a relació constant palmitoil-CoA/BSA, les corbes velocitat/substrat són hiperbòliques.

De totes formes, els resultats obtinguts amb la carnitinpalmoiltransferasa no es poden extrapolar, com veurem posteriorment, a l'acil-CoA hidrolasa, doncs el primer és un enzim integral de membrana, i en canvi l'acil-CoA hidrolasa és un enzim associat a la membrana microsomal.

## PART EXPERIMENTAL

## METODOLOGIA



## 1. ANIMAL D'EXPERIMENTACIO

S'han utilitzat rates Sprague-Dawley mascle procedents de l'estabulari de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, de 7-8 setmanes d'edat i pes comprès entre 200 i 240 grams.

Els animals es van mantenir amb aigua i dieta estàndar (Panlab A-04) "ad libitum", i 12 hores abans de l'assaig es van posar en dejuni.

La temperatura de l'estabulari es va mantenir constant ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) amb un ritme circadià de llum / obscuritat de 12 hores (8 AM / 8 PM) i renovació periòdica de l'aire.

## 2. OBTENCIO DE LES FRACCIONS MITOCONDRIAL, CITOSOLICA I MICROSOMAL HEPATIQUES

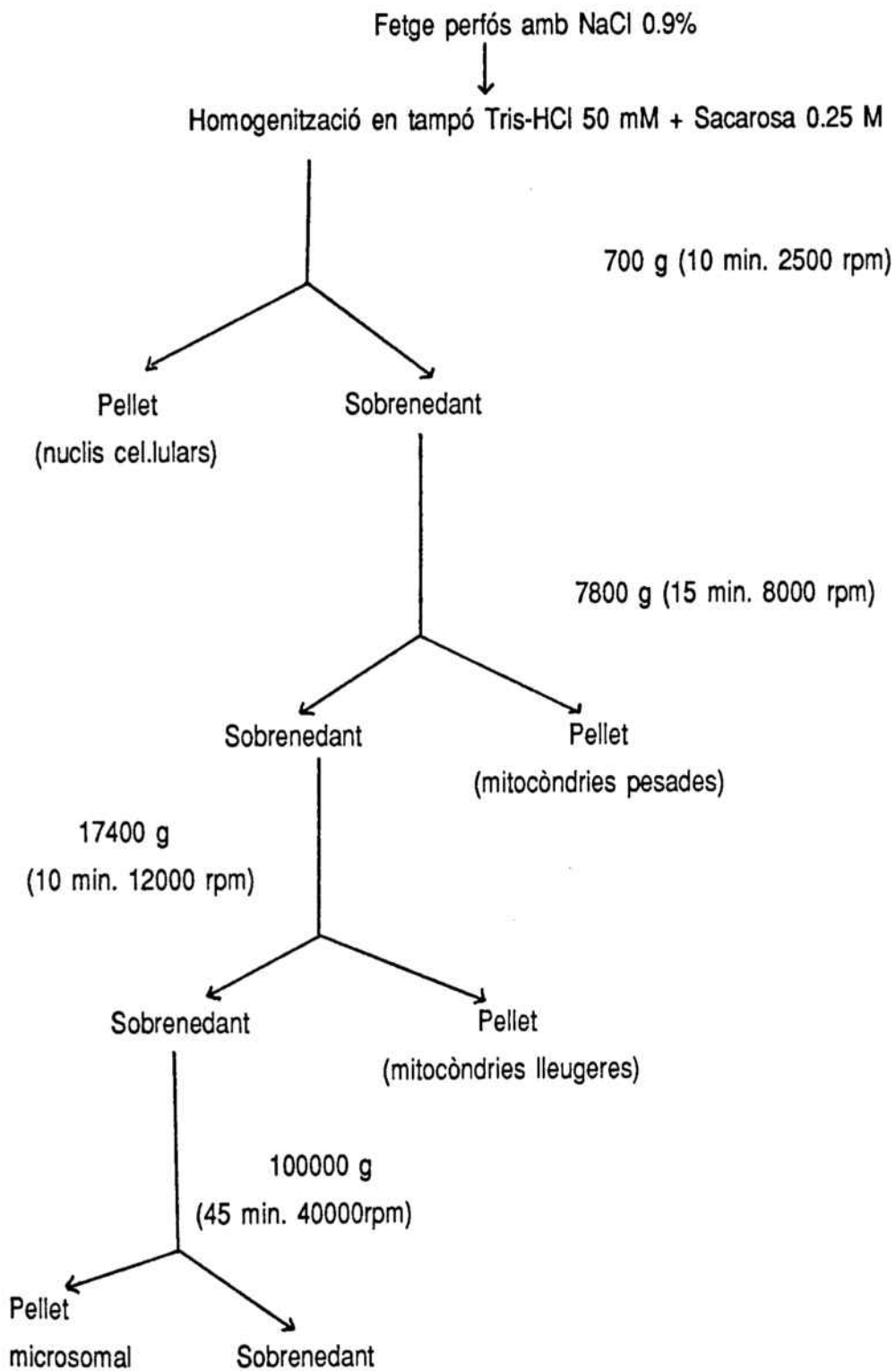
En cada assaig s'han utilitzat els fetges obtinguts de dos animals, sacrificats mitjançant dislocació cervical i posterior exsanguinació ( Nagi i col., 1989 ) . Els fetges s'extreuen i es perfonen amb solució salina de NaCl 0.9% refredada a  $4^{\circ}\text{C}$ , per tal d'eliminar restes d'hematies i hemoglobina que podrien interferir en posteriors assaigs. Els dos fetges es sequen sobre paper de filtre i se'n pesen 5 grams de cadascún.

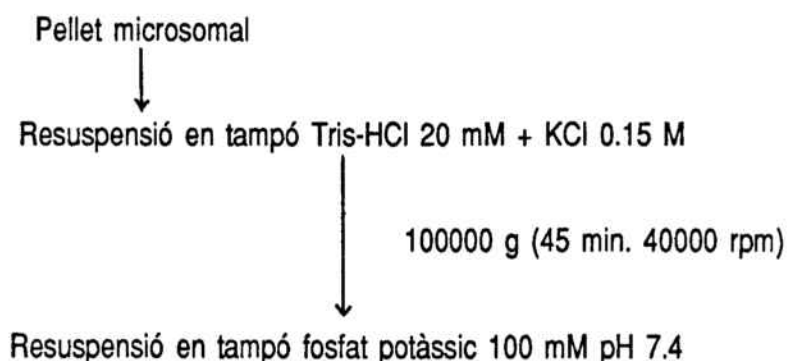
El teixit s'homogenitza dues vegades durant 10 segons en un homogenitzador tipus Politron ( rotor PTA 20 TS, posició 4 ), mantenint el tub que conté el teixit en un bany de gel per evitar la degradació dels enzims tissulars. El tampó d'homogenització és Tris-HCl 50 mM + sacarosa 0.25 M pH 7.4 (80 ml per cada 10 g de fetge).

L'homogenat es centrifuga a 2500 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant es transfereix a uns altres tubs i es torna a centrifugar 15 minuts a 8000 rpm. Per decantació es separa el pellet, que conté les mitocòndries pesades, i el sobrenedant, que es centrifuga a 12000 rpm durant 10 minuts. Com a resultat d'aquesta tercera centrifugació, s'obté un pellet que conté les mitocòndries lleugeres. Totes aquestes operacions s'han realitzat en una centrífuga Beckmann d'alta velocitat ( J2-21 ), refrigerada a 4°C.

El darrer sobrenedant obtingut, es transfereix a tubs d'ultracentrífuga i es centrifuga a 40000 rpm durant 45 minuts a 4°C ( Beckmann L-8-55M, rotor Ty 65 ). Un cop acabada la centrifugació, s'eliminen per aspiració els lípids i es recull amb pipeta Pasteur el sobrenedant, que correspon a la fracció citosòlica. El pellet, que conté els microsomes, es resuspèn en tampó Tris-HCl 20 mM, KCl 0.15 M, i es torna a centrifugar a 40000 rpm durant 45 minuts, per tal d'eliminar proteïnes citosòliques o de matriu peroxisòmica que puguin quedar adherides a la superfície dels microsomes. A l'acabar la centrifugació, es descarta el sobrenedant, i el pellet es resuspèn en tampó fosfat potàssic 100 mM pH 7.4.

En la següent pàgina es representa esquemàticament el procés descrit:





La concentració proteica de cadascuna de les fraccions obtingudes es determina pel mètode de Bradford.

Les diverses fraccions obtingudes es congelen a  $-30^{\circ}\text{C}$  fins la seva utilització.

### 3. OBTENCIO DE LA FRACCIO CITOSOLICA CEREBRAL

Per obtenir la fracció citosòlica del cervell, es parteix de 4 animals, que es sacrifiquen per dislocació cervical. Els cervells s'extreuen, es prenen els dos hemisferis i es pesen.

El teixit s'homogenitza en una proporció de 1 g de cervell per 8 ml de tampó Tris-HCl 50 mM + Sacarosa 0.32 M.

Per aquesta operació s'ha utilitzat un homogenitzador Potter-Elvehjem ( posició 5-6, 10 segons), i s'ha mantingut el tub que conté el teixit en un bany de gel.

L'homogenat així obtingut es centrifuga a 2500 rpm durant 10 minuts, s'elimina el pellet i el sobrenedant es centrifuga de nou 15 minuts a 8000 rpm. El pellet obtingut es descarta i el sobrenedant es sotmet a una tercera centrifugació (12000 rpm, 10 minuts). Aquestes operacions es realitzen en una centrífuga Beckmann d'alta velocitat J2-21, refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El sobrenedant de la tercera centrifugació es transfereix per decantació a tubs d'ultracentrífuga, i es centrifuga a 40000 rpm durant 45 minuts ( Ultracentrífuga Beckmann L-8-55 M, rotor Ty65, 4°C).

Un cop acabada la centrifugació, es recull amb pipeta Pasteur el sobrenedant, que correspon a la fracció citosòlica, i es determina la concentració proteica pel mètode de Bradford.

#### 4. PARAMETRES ENZIMATICS DETERMINATS

Per totes les activitats enzimàtiques descrites a continuació, l'efecte dels fàrmacs en estudi es va determinar addicionant aquests al medi d'incubació en forma de sal sòdica a partir d'una solució mare preparada amb NaOH 0.1 N pH 8. Es va comprovar que pel màxim volum de solució de fàrmac afegit, corresponent a una concentració de fàrmac de 5 mM, no variava el pH del medi d'incubació. L'activitat enzimàtica de totes les mostres assajades s'ha valorat per duplicat.

Els fàrmacs utilitzats en aquest treball han estat:

- Acid clofíbric (Sigma)
- Bezafibrat (Lab. Andreu)
- Gemfibrozil (Lab. Menarini)

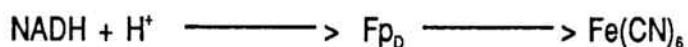
Tots els reactius dels quals no se n'indica la procedència s'han obtingut de fonts comercials en el grau màxim de puresa disponible.

## 4.1. ENZIMS MICROSOMALS

### 4.1.1. NADH-Citocrom-b<sub>5</sub>-reductasa (EC 1.6.2.2)

#### \* Fonament

Els electrons procedents del NADH són vehiculitzats fins la NADH-citocrom-b<sub>5</sub>-reductasa i redueixen el ferricianur potàssic. Es monitoritza la taxa d'oxidació del NADH a 340 nm, utilitzant un coeficient d'extinció de 6.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.



#### \* Reactius utilitzats:

.Tampó fosfat potàssic 0.1 M, pH 7.4

.Ferricianur potàssic 5 mM

.NADH 3 mM (Sigma)

#### \* Metodica:

En cada cubeta s'hi posa:

. Tampó fosfat potàssic en quantitat suficient per un ml

. 50 µl de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM

. Suspensió microsomal en la quantitat necessària

S'agita bé i es manté 5 minuts a temperatura ambient. Llavors s'hi afegeixen 50 µl de NADH 3 mM, i es llegeix la taxa de oxidació del NADH a 340 nm.

\* Resultats:

L'activitat enzimàtica s'expressa en nmols/min/mg de proteïna microsomal. A partir del'increment d'absorbància per minut i del coeficient d'absorció molar ( $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), apliquem la llei de Beer:

$A = a \cdot b \cdot c$ , on  $a = \text{coef d'abs (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ ,  $b = 1 \text{ cm}$  i  $c = \text{concentració del producte (mM)}$ . Així obtenim els mmols/l/min de producte transformat per l'enzim.

Per expressar els resultats en nmol/min/mg de proteïna, cal tenir en compte:

- factor de transformació de l a ml
- factor de transformació de mmols a nmols
- concentració de proteïna en la cubeta

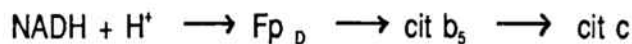
Així deduïm la següent fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} = \frac{A/\text{min}}{6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \cdot \frac{10^6 \text{ nmol}}{1 \text{ mmol}} \cdot \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1}{\text{"x"} \text{ mg prot/ml}}$$

#### 4.1.2. NADH-citocrom c-reductasa

\* Fonament

L'activitat enzimàtica es determina segons el mètode de Yasukochi i Master (1976), que es basa en mesurar la taxa de reducció del citocrom c utilitzant un coeficient d'extinció de  $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



En realitat, no es mesura una sola activitat enzimàtica, sinó el flux d'electrons del NADH a la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa i d'aquesta al citocrom  $b_5$ .

\* Reactius utilitzats

- Tampó fosfat potàssic 0.1 M, pH 7.4
- KCN 9 mM
- Citocrom c 1.6 mM (procedent de cor de cavall, tipus III, ; Sigma)
- EDTA 1 mM (Merck)
- NADH 3 mM

\* Metòdica

En la cubeta del espectrofotòmetre s'hi posa:

- . 30  $\mu$ l de KCN 9 mM
- . 30  $\mu$ l de citocrom c
- . 100  $\mu$ l d'EDTA 1 mM
- . Suspensió microsomal en la quantitat necessària
- . Tampó fosfat potàssic en quantitat suficient per 1 ml

S'agita i es manté a 37°C durant 5 minuts. Llavors s'inicia la reacció afegint 40  $\mu$ l de NADH 3 mM i es mesura l'increment d'absorbància a 550 nm.

\* Resultats

Es calcula l'activitat enzimàtica com ja s'ha esmentat, utilitzant un coeficient d'absorció de 18.5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>



#### 4.1.3. NADPH-citocrom c-reductasa (EC 1.6.2.4)

##### \* Fonament

La segona cadena de transport electrònic microsomal utilitza NADPH; els electrons flueixen des de la NADPH-citocrom c-reductasa fins el citocrom P-450 i també fins l'acceptor artificial, el citocrom c.

L'activitat NADPH-citocrom c-reductasa es determina a l'igual que la NADH-citocrom c-reductasa, però utilitzant NADPH en comptes de NADH.

#### 4.1.4. Acil-CoA hidrolasa (EC 3.2.2.1)

##### \* Fonament

L'acil-CoA hidrolasa està àmpliament distribuïda en diferents òrgans de varies espècies animals: fetge, ronyó, cervell, testicles i mucosa intestinal.

L'acil-CoA hidrolasa microsomal i la mitocondrial s'han assajat en fetge; en canvi, hem utilitzat cervell per assajar l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica.

Encara que són tres enzims diferents amb localització cel.lular diferent, el mètode seguit per determinar l'activitat és el mateix, i per això s'inclouen en el mateix apartat.

L'acil-CoA hidrolasa actua trencant l'enllaç establert entre l'àcid gras i el coenzim A. El mètode espectrofotomètric utilitzat per determinar l'activitat d'aquest enzim (Berge i col., 1979) es basa en mesurar l'increment d'absorbància que es produeix degut a la formació d'un complex entre el CoA alliberat com a resultat de l'acció de l'enzim i el DTNB afegit al medi de reacció.

\* Reactius utilitzats

- Tampó HEPES (Sigma) 30 mM + EDTA 1 mM, pH 7.4
- BSA lliure d'àcids grassos, fracció V (Sigma) (8 mg/ml de tampó)
- DTNB 6 mM (Fluka)
- Palmitoil-CoA 1 mM (Sigma)

\* Metodologia

En una cubeta d'espectofotòmetre s'hi posa:

- . Tampó HEPES 30 mM + EDTA 1 mM en quantitat suficient per 1 ml
- . 40  $\mu$ l de BSA (quan es requereixi)
- . Microsomes, mitocòndries o citosol en quanti-tat necessària

Es preincuba durant 5 minuts a 35°C, i s'afegeixen a la cubeta 50  $\mu$ l de DTNB 6 mM. Es mesura l'increment d'absorbància a 412 nm ( $\Delta A_1$ ), que serà degut a la reacció dels grups sulfhidril endògens. Llavors s'addicionen 40  $\mu$ l de Palmitoil-CoA 1 mM (relació 120 nmol Pal-CoA/mg BSA), i es mesura l'increment d'absorbància total ( $\Delta A_2$ ) a 412 nm.

\* Resultats

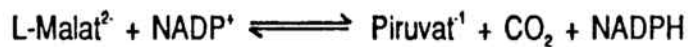
A partir de la resta de  $\Delta A_2 - \Delta A_1$  obtindrem l'activitat de l'enzim sobre el substrat afegit exògenament, i utilitzant un coeficient d'absorció de  $1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  s'expressen els resultats en nmol/min/mg proteïna.

## 4.2. ENZIMS CITOSOLICS

### 4.2.1. Enzim màlic (EC 1.1.1.40 L-malat:NADP oxidoreductasa)

#### \* Fonament

La determinació de l'activitat de l'enzim màlic es basa en la següent reacció:



La formació de NADPH es segueix en l'espectrofotòmetre a la longitud d'ona de 340 nm (Ochoa, 1955)

#### \* Reactius utilitzats

- Tampó Tris (Sigma)- HCl 30 mM, pH 7.4
- MnCl<sub>2</sub> 20 mM
- NADP<sup>+</sup> 1.2 mM (Sigma)
- L-Malat 10 mM (Sigma)

#### \* Metòdica

En una cubeta d'espectrofotòmetre s'hi posa:

- . Tampó Tris-HCl en quantitat suficient, per 1 ml
- . 50 µl de MnCl<sub>2</sub> 20 mM
- . Citosol en quantitat necessària

S'agita i es manté a 37°C durant 5 minuts. S'addicionen 50 µl de NADP<sup>+</sup> 1.2 mM, i es llegeix la variació d'absorbància durant 2 o 3 minuts, ( $\Delta A_1$ ) la qual és deguda a l'activitat de l'enzim sobre el malat que hi ha present al citosol. Llavors s'afegeixen 50 µl de L-malat 10 mM, i es mesura l'increment d'absorbància a 340 nm durant 3 minuts ( $\Delta A_2$ )

### \* Resultats

Per calcular l'activitat de l'enzim sobre el substrat extern, partim de l'increment d'absorbància que resulta de restar el total ( $\Delta A_2$ ) del degut al substrat que ja porta el citosol ( $\Delta A_1$ ). El resultat s'expressa en nmol/min/mg proteïna, utilitzant un coeficient d'extinció de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.2.2. Màlic deshidrogenasa (EC 1.1.1.37 L-malat:NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa)

#### \* Fonament

L'enzim màlic deshidrogenasa catalitza la següent reacció:



L'activitat d'aquest enzim es determina, segons el mètode de Gutmann i Wahlefeld, mesurant la formació de NADH a través de l'increment d'absorbància a 340 nm.

#### \* Reactius utilitzats:

- Tampó DEA (Merck) 90 mM +  $\text{MgCl}_2$  4.5 mM
- NAD<sup>+</sup> 58 mM (Sigma)
- L-Malat 500 mM (Sigma)

#### \* Metòdica

En la cubeta espectrofotomètrica s'hi posen:

- . Tampó DEA +  $\text{MgCl}_2$  en quantitat suficient per 1 ml
- . Citosol en la quantitat necessària

S'agita bé i es preincuba durant 5 minuts a 37°C. S'inicia la reacció afegint 50  $\mu\text{l}$  de NAD<sup>+</sup> 58 mM, i es mesura l'increment d'absorbància a 340 nm,  $\Delta A_1$ , que és degut a l'acció de l'enzim sobre el substrat present al citosol. Llavors s'addicionen 55  $\mu\text{l}$  de L-Malat 500 mM i es mesura l'increment d'absorbància ( $\Delta A_2$ ), que resultarà de l'acció de l'enzim sobre el total del substrat, l'endògen i l'afegit externament.

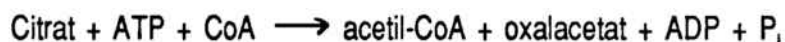
\* Resultats

A partir de la diferència entre  $\Delta A_2$  i  $\Delta A_1$  i realitzant les transformacions ja esmentades, expressem l'activitat màlic deshidrogenasa en nmol/min/mg proteïna, utilitzant un coeficient d'extinció de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

4.2.3. Enzim escissor del citrat (EC 4.1.3.8 ATP:citrat oxalacetat liasa)

\* Fonament

Quan el citrat s'incuba amb ATP, CoA,  $\text{Mg}^{2+}$ , i l'enzim escissor del citrat, té lloc la següent reacció:



L'activitat d'aquest enzim es determina segons el mètode de Srere (1959), que es basa en mesurar la formació d'un dels productes d'aquesta reacció, l'oxalacetat. La velocitat de formació de l'oxalacetat es determina mitjançant la reacció d'aquest amb NADPH en presència de màlic deshidrogenasa (és suficient la màlic deshidrogenasa que conté el citosol perquè tingui lloc la reacció).

\* Reactius utilitzats

- Tampó Tris-HCl 100 mM pH 7.4
- $\text{MgCl}_2$  250 mM
- DTT 125 mM (Sigma)
- Citrat potàssic 525 mM (Panreac)
- CoA 7.5 mM (Sigma)
- NADPH 5 mM (Sigma)
- ATP 125 mM (Merck)

### \* Metodologia

En una cubeta d'espectrofotòmetre s'hi posa:

- . Tampó Tris-HCl en quantitat suficient per un mililitre
- . 40  $\mu$ l de  $MgCl_2$  250 mM
- . 40  $\mu$ l de DTT 125 mM
- . 40  $\mu$ l de citrat potàssic 525 mM
- . 40  $\mu$ l de CoA 7.5 mM
- . citosol en quantitat suficient

Es manté a 37°C durant 5 minuts, i s'inicia la reacció afegint 40  $\mu$ l de NADH 5 mM. Es mesura la disminució d'absorbància a 340 nm durant 2 o 3 minuts ( $\Delta A_1$ ); llavors s'hi addicionen 40  $\mu$ l de ATP 125 mM i es mesura la disminució d'absorbància a 340 nm ( $\Delta A_2$ ).

### \* Resultats

A partir de la diferència  $\Delta A_2 - \Delta A_1$ , i fent les transformacions necessàries (coeficient d'absorció  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) s'expressa l'activitat en nmol/min/mg proteïna.

#### 4.2.4. Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfat:NADP<sup>+</sup> 1-oxidoreductasa)

### \* Fonament

L'activitat Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa es determina segons el mètode de Dror i col. (1970), basat en la següent reacció:



L'increment d'absorbància a 340 nm degut a la formació de NADPH, és una mesura de l'activitat glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

\* Reactius utilitzats

- Tampó Tris-HCl 30 mM pH 7.4
- $MgCl_2$  300 mM
- NADP<sup>+</sup> 3 mM
- Glucosa-6-fosfat 4 mM (Sigma)

\* Metodologia

En una cubeta d'espectrofotòmetre s'hi posa:

- . Tampó Tris-HCl en quantitat suficient per 1 mil·lilitre
- . 50  $\mu$ l de  $MgCl_2$  300 mM
- . citosol en quantitat suficient

Es preincuba durant 5 minuts a 37°C. Llavors s'hi afegeixen 50  $\mu$ l de NADP<sup>+</sup> 3 mM i es llegeix la variació d'absorbància a 340 nm durant 2 o 3 minuts. Aquest increment d'absorbància ( $\Delta A_1$ ) correspon a l'activitat de l'enzim sobre el substrat present al citosol. Seguidament s'addicionen 50  $\mu$ l de glucosa-6-fosfat, i es mesura l'increment d'absorbància a 340 nm,  $\Delta A_2$ , que és el degut al total de substrat present.

\* Resultats

A partir de la resta  $\Delta A_2 - \Delta A_1$ , es calcula l'activitat en nmol/min/mg de proteïna, utilitzant un coeficient d'extinció de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

## 5. PARAMETRES NO ENZIMATICS

### 5.1. Determinació de la concentració proteica: Mètode de Bradford

El mètode de Bradford (Bradford, 1976), elimina la major part dels problemes que presenten altres mètodes de determinació de la concentració proteica, com són el procediment de Lowry o l'assaig de Biuret. Es basa en el fet que el colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 existeix en dues formes de colors diferents, vermell i blau. La forma vermella es converteix en la forma blava

a l'unir-se el colorant a les proteïnes. El complexe proteïna-colorant té un alt coeficient d'extinció, el qual permet una alta sensibilitat en la mesura de la proteïna. La unió del colorant a la proteïna és un procés molt ràpid i el complexe format és força estable.

Per preparar el reactiu, 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) es dissolen en 50 ml d'etanol 95%. A aquesta solució s'hi addicionen 100 ml d'àcid fosfòric del 85%. La solució resultant es dilueix amb aigua destil·lada fins un volum final de 1 litre.

Per determinar la concentració proteica de la mostra, es prepara una recta de calibrat utilitzant BSA com a patró (2, 4, 6, 8 i 10 µg de BSA/ml). Així mateix es prepara un blanc i quatre tubs amb dos volums diferents d'una dilució de la mostra. Es completa el volum de cada tub amb aigua destil·lada fins a 50 µl i s'afegeix un ml del reactiu. Després de 15 minuts, s'efectua la lectura a 595 nm. Per interpolació amb la recta, es determina la concentració de proteïna present a la mostra.

La recta de calibrat es realitza per duplicat cada vegada que es vol determinar la concentració de proteïna.



RESULTATS

## I. IDENTIFICACIO DE L'ACCIO FARMACOLOGICA

Abans de començar la valoració de l'acció dels fàrmacs sobre els enzims en estudi, es va determinar la concentració proteica òptima de treball. Per fer-ho es va establir per a cada enzim el rang de concentracions proteiques en el que existia una relació linial entre aquestes i l'activitat enzimàtica:

- NADH-citocrom c reductasa: 0-150 µg proteïna
- NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa: 0-200 µg proteïna
- NADPH-citocrom c reductasa: 0-200 µg proteïna
- Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa: 0-400 µg proteïna
- Enzim màlic: 0-200 µg proteïna
- Enzim escissor del citrat: 0-1200 µg proteïna
- Màlic deshidrogenasa: 0-200 µg proteïna
- Acil-CoA hidrolasa ms: 0-100 µg proteïna
- Acil-CoA hidrolasa mt: 0-200 µg proteïna
- Acil-CoA hidrolasa cit: 0-100 µg proteïna

En les figures I-1 a I-10 es mostren les gràfiques corresponents. En totes elles s'ha indicat l'equació de la línia de regressió obtinguda, excepte en aquells casos en que el coeficient de correlació calculat amb els valors d'activitat per totes les concentracions proteiques assajades, ha estat inferior a 0.900 (enzim màlic, màlic deshidrogenasa i acil-CoA hidrolasa microsomal i citosòlica).

En les Taules I-1 a I-8 es mostren els valors de l'activitat de cadascun d'aquests enzims en absència i en presència de dues concentracions de fàrmac (1 i 5 mM).

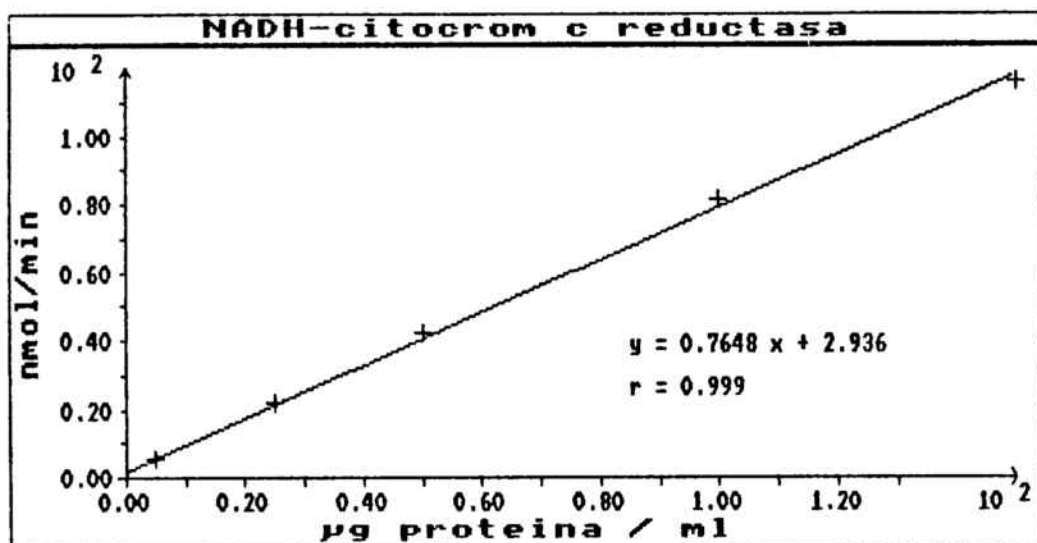


Figura I-1

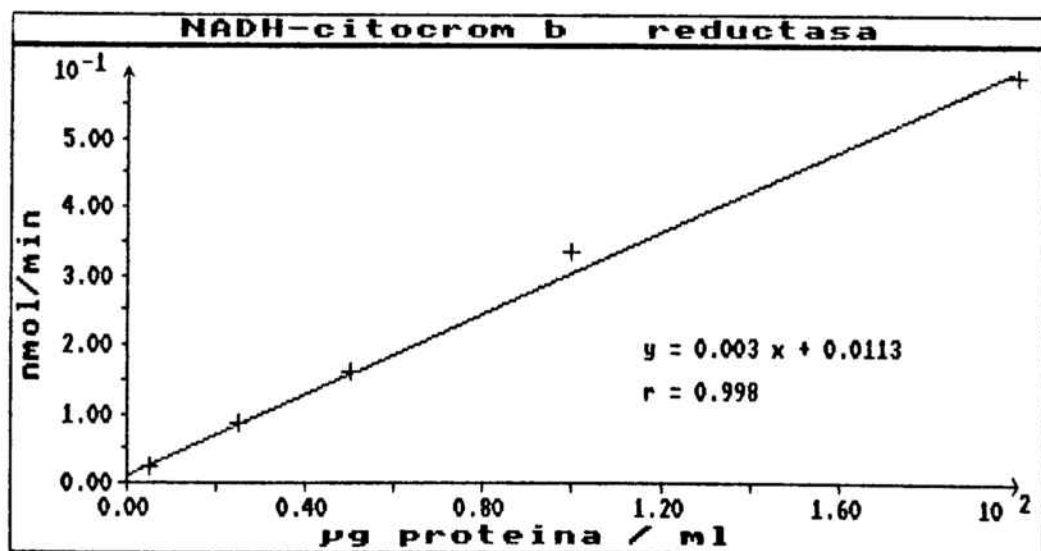


Figura I-2

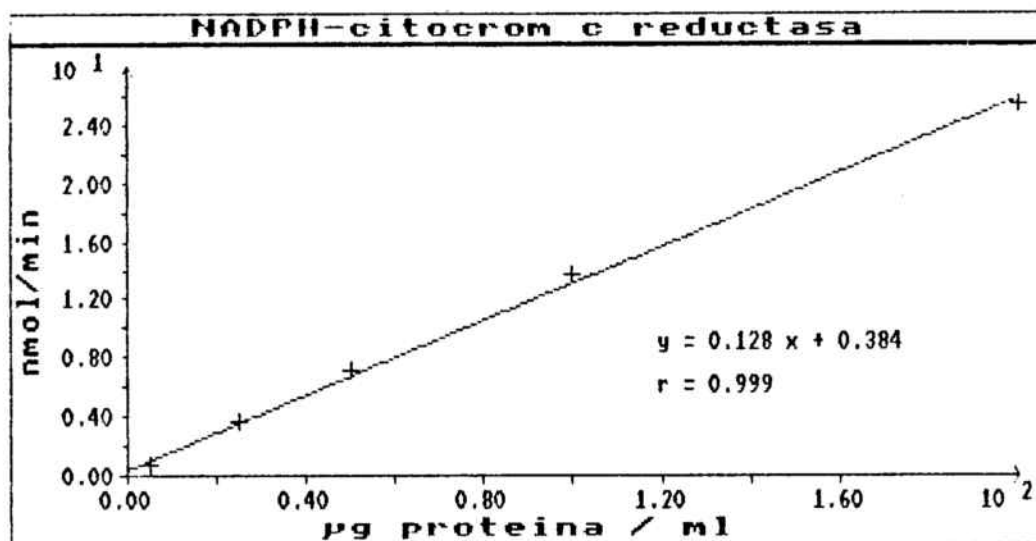


Figura I-3

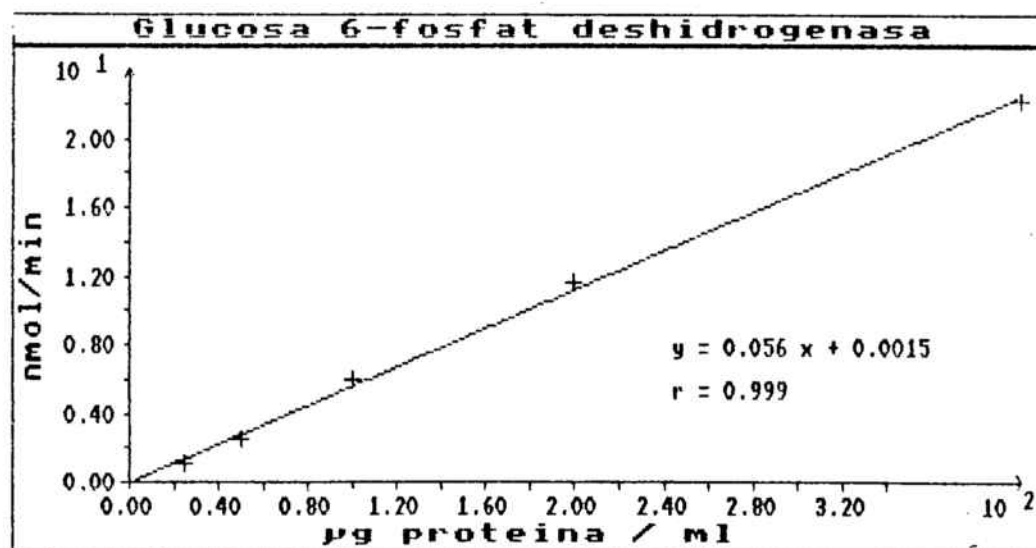


Figura I-4

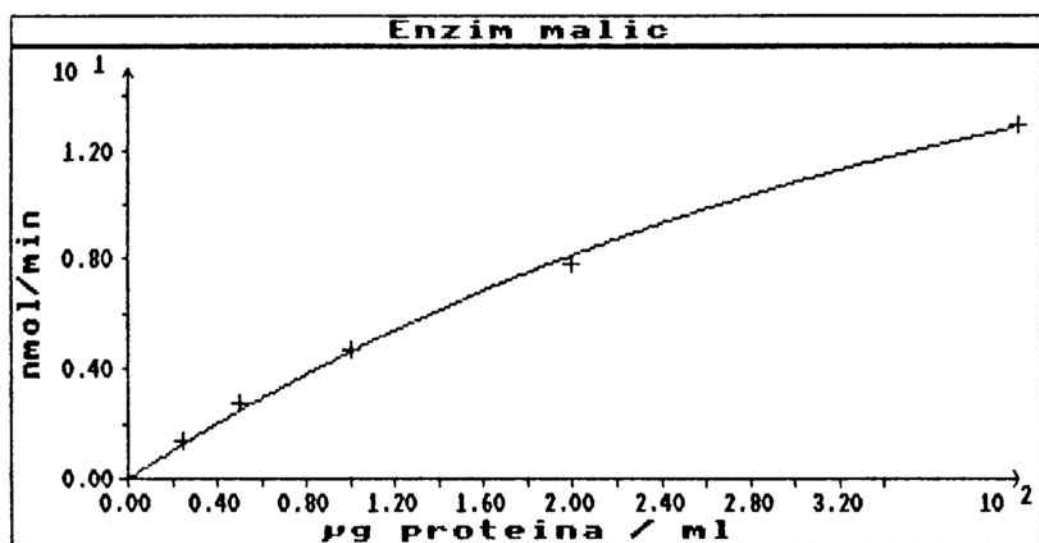


Figura I-5

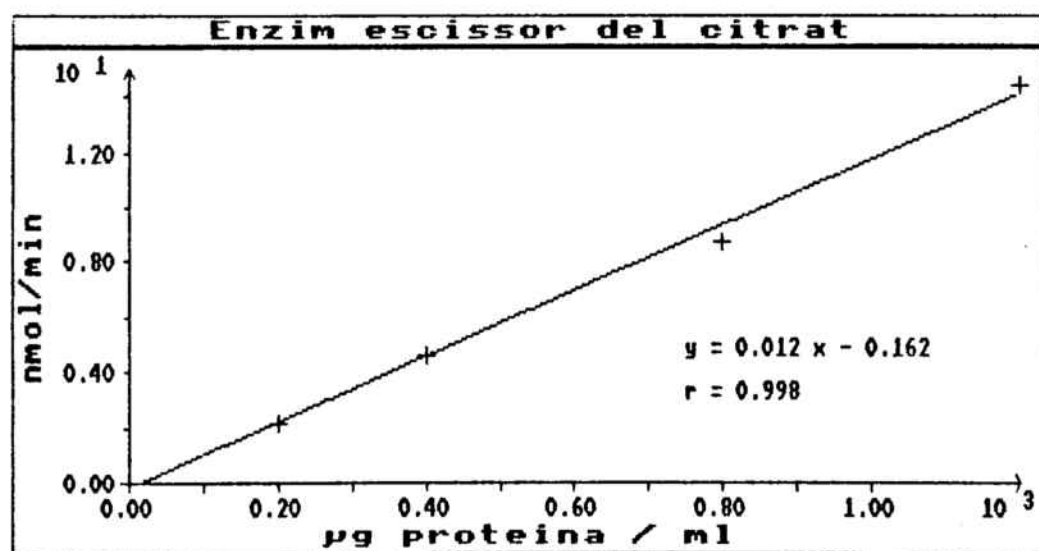


Figura I-6

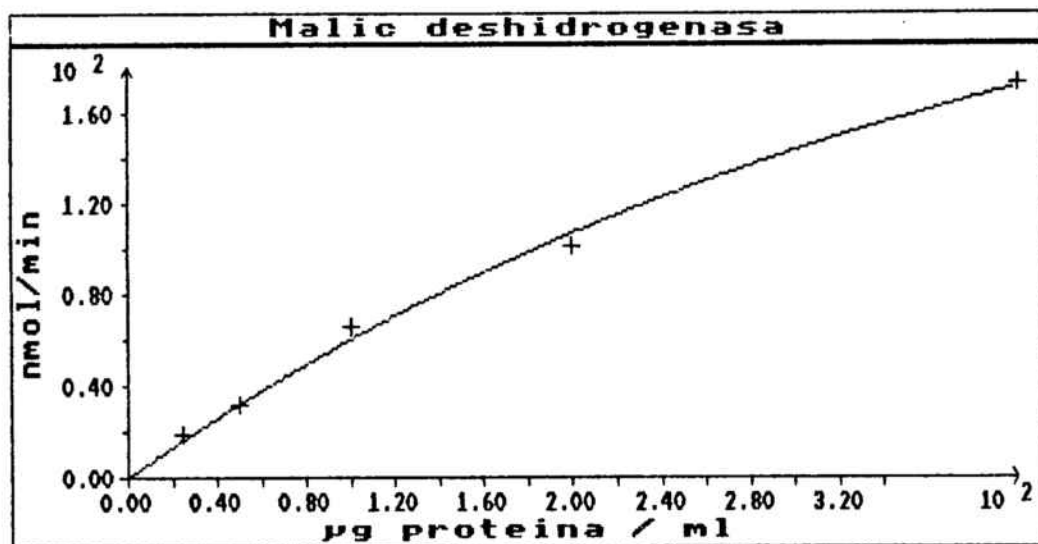


Figura I-7

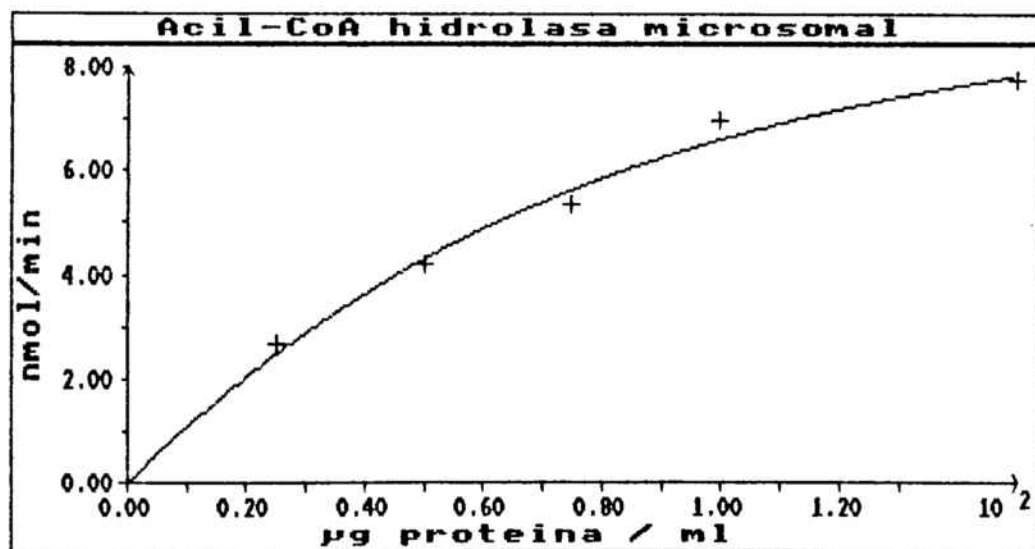


Figura I-8

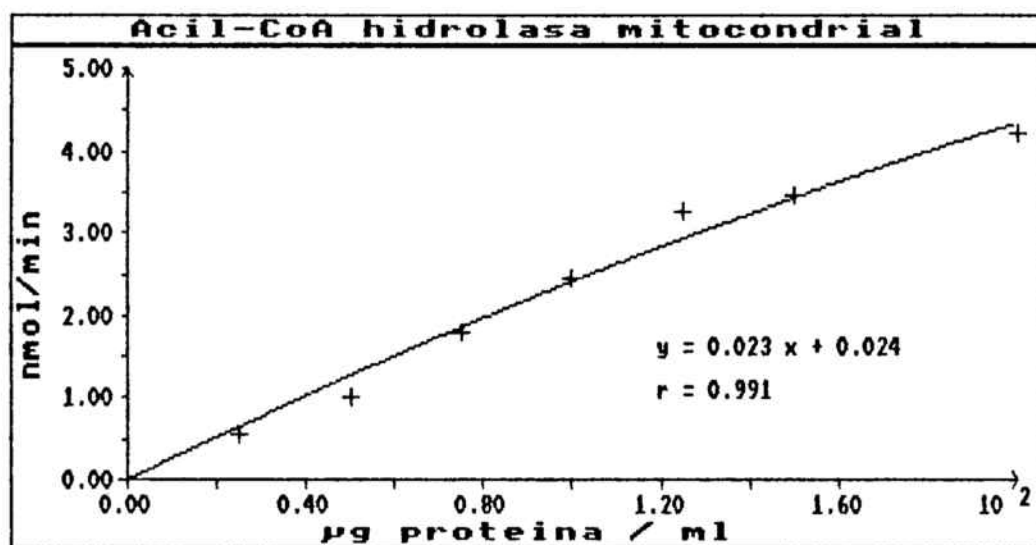


Figura I-9

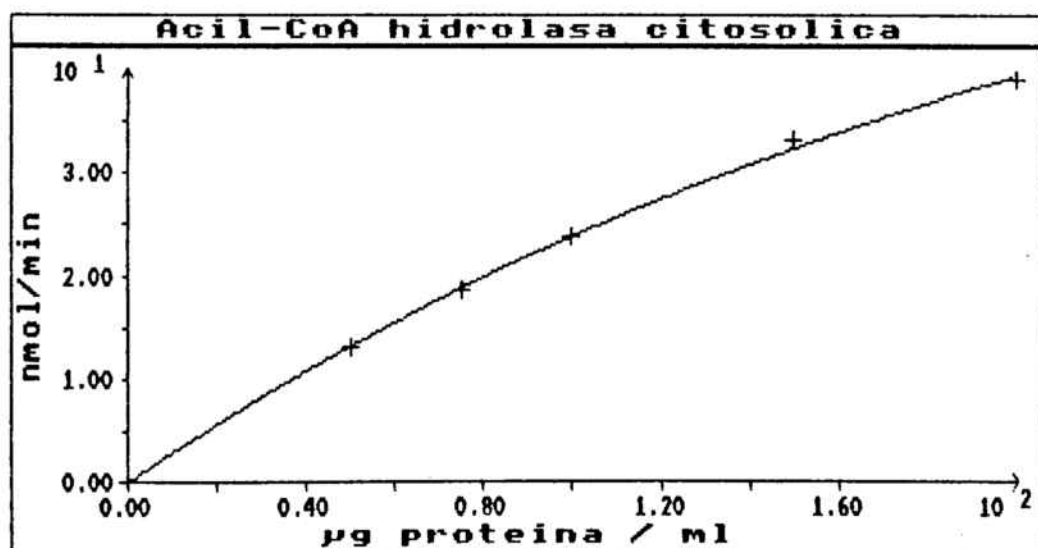


Figura I-10



TAULA I-1. NADH-CITOCROM C REDUCTASA

\* 100 µg proteïna /ml

|         | Activitat                 | Estimulació |
|---------|---------------------------|-------------|
| Control | 1691.0<br>(1566.0-1816.0) | 0%          |
| CFB 1mM | 1812.5<br>(1725.0-1900.0) | 7.3%        |
| CFB 5mM | 2041.0<br>(1952.0-2130.0) | 20.8%       |
| BZF 1mM | 1920.0<br>(1770.0-2070.0) | 13.5%       |
| BZF 5mM | 2178.0<br>(1997.0-2360.0) | 28.7%       |
| GFB 1mM | 2061.0<br>(1952.0-2170.0) | 22.0%       |
| GFB 5mM | 3289.0<br>(3178.0-3400.0) | 95.0%       |

\* 25 µg proteïna / ml

|         | Activitat                 | Estimulació |
|---------|---------------------------|-------------|
| Control | 2581.0<br>(1522.0-3460.0) | 0%          |
| CFB 5mM | 3119.0<br>(1918.0-4320.0) | 25.4%       |
| BZF 5mM | 3696.0<br>(2072.0-5320.0) | 41.0%       |
| GFB 5mM | 5056.0<br>(3112.0-7000.0) | 98.0%       |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna, corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents.

TAULA I-2. NADH-CITOCROM B<sub>5</sub> REDUCTASA

\* 100 µg proteïna /ml

|         | Activitat                 |
|---------|---------------------------|
| Control | 6445.4<br>(6272.8-6618.0) |
| CFB 1mM | 6243.7<br>(6135.0-6352.5) |
| CFB 5mM | 6909.2<br>(6588.0-7230.5) |
| BZF 1mM | 6672.0<br>(6525.0-6819.0) |
| BZF 5mM | 6085.5<br>(6058.0-6113.0) |
| GFB 1mM | 6494.0<br>(6400.0-6588.0) |
| GFB 5mM | 6381.0<br>(5882.0-6880.0) |

\* 25 µg proteïna / ml

|         | Activitat                 |
|---------|---------------------------|
| Control | 7621.3<br>(7480.0-7762.6) |
| CFB 5mM | 7067.0<br>(6724.0-7410.0) |
| BZF 5mM | 6480.0<br>(6080.0-6880.0) |
| GFB 5mM | 6320.0<br>(5760.0-6880.0) |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents

TAULA I-3. NADPH-CITOCROM C REDUCTASA

\* 100 µg proteïna /ml

|         | Activitat              |
|---------|------------------------|
| Control | 327.0<br>(261.4-392.7) |
| CFB 1mM | 350.7<br>(280.0-421.5) |
| CFB 5mM | 355.0<br>(295.0-415.0) |
| BZF 1mM | 359.0<br>(290.0-428.0) |
| BZF 5mM | 353.2<br>(285.0-421.5) |
| GFB 1mM | 326.0<br>(250.0-402.0) |
| GFB 5mM | 376.7<br>(306.0-447.5) |

\* 25 µg proteïna / ml

|         | Activitat              |
|---------|------------------------|
| Control | 361.2<br>(270.4-452.0) |
| CFB 5mM | 352.4<br>(284.8-420.0) |
| BZF 5mM | 352.2<br>(276.4-428.0) |
| GFB 5mM | 379.8<br>(293.6-466.0) |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents.

TAULA I-4. GLUCOSA-6-FOSFAT DESHIDROGENASA

\* 300 µg proteïna / ml

|         |                     | ActivitatInhibició |
|---------|---------------------|--------------------|
| Control | 55.4<br>(42.3-68.5) | 0%                 |
| CFB 1mM | 51.1<br>(37.3-64.9) | 0%                 |
| CFB 5mM | 30.9<br>(13.6-48.3) | 44.2%              |
| BZF 1mM | 48.8<br>(39.5-58.1) | 11.9%              |
| BZF 5mM | 10.3<br>(12.5- 8.1) | 81.4%              |
| GFB 1mM | 32.2<br>(12.8-51.6) | 41.8%              |
| GFB 5mM | 4.4<br>(0.0-8.9)    | 92.0%              |

\* 100 µg proteïna /ml

|         | Activitat           | Inhibició |
|---------|---------------------|-----------|
| Control | 55.1<br>(40.6-69.7) | 0%        |
| CFB 5mM | 21.5<br>(12.0-31.0) | 60.9%     |
| BZF 5mM | 8.3<br>(10.8- 5.8)  | 84.9%     |
| GFB 5mM | 0.0<br>( 0.0- 0.0)  | 100.0%    |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels valors obtinguts amb dues preparacions de citosol diferents.



TAULA I-5. ENZIM MALIC

\* 200 µg proteïna /ml

|         | Activitat           | Inhibició |
|---------|---------------------|-----------|
| Control | 27.6<br>(21.5-33.7) | 0%        |
| CFB 1mM | 26.6<br>(21.1-32.2) | 0%        |
| CFB 5mM | 25.2<br>(22.0-28.4) | 8.7%      |
| BZB 1mM | 28.4<br>(22.8-34.0) | 0%        |
| BZF 5mM | 26.2<br>(22.3-30.0) | 5.0%      |
| GFB 1mM | 24.1<br>(20.2-28.1) | 12.6%     |
| GFB 5mM | 11.7<br>( 8.4-15.0) | 57.6%     |

\* 50 µg proteïna/ ml

|         | Activitat           | Inhibició |
|---------|---------------------|-----------|
| Control | 32.3<br>(22.4-42.3) | 0%        |
| CFB 5mM | 29.7<br>(20.0-39.5) | 8.0%      |
| BZF 5mM | 28.1<br>(20.8-35.4) | 13.0%     |
| GFB 5mM | 7.8<br>( 0.0-15.6)  | 75.8%     |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja de les obtingudes a partir de dues preparacions de citosol diferents.

TAULA I-6. ENZIM ESCISSOR DEL CITRAT

\* 800 µg proteïna /ml

|         | Activitat           |
|---------|---------------------|
| Control | 16.5<br>(14.0-19.0) |
| CFB 1mM | 15.9<br>(15.7-16.1) |
| CFB 5mM | 16.5<br>(15.9-17.2) |
| BZF 1mM | 14.0<br>(11.1-16.9) |
| BZF 5mM | 12.4<br>(10.4-14.4) |
| GFB 1mM | 14.3<br>(13.4-15.2) |
| GFB 5mM | 12.6<br>( 9.2-16.1) |

\* 200  $\mu\text{g}$  proteïna /ml

|         | Activitat           |
|---------|---------------------|
| Control | 12.9<br>(11.5-14.4) |
| CFB 5mM | 14.2<br>( 8.8-19.6) |
| BZF 5mM | 10.8<br>(10.0-11.7) |
| GFB 5mM | 4.9<br>( 3.0- 6.8)  |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions de citosol diferents.

TAULA I-7. MALIC DESHIDROGENASA

\* 100 µg proteïna / ml

|         | Activitat              |
|---------|------------------------|
| Control | 712.5<br>(666.3-759.1) |
| CFB 1mM | 687.3<br>(623.0-751.6) |
| CFB 5mM | 656.5<br>(601.8-711.3) |
| BZF 1mM | 649.0<br>(638.1-750.0) |
| BZF 5mM | 654.3<br>(620.7-688.7) |
| GFB 1mM | 679.6<br>(660.9-698.4) |
| GFB 5mM | 711.9<br>(680.4-743.5) |

\* 25 µg proteïna /ml

|         | Activitat              |
|---------|------------------------|
| Control | 799.3<br>(711.0-887.1) |
| CFB 5mM | 711.2<br>(629.0-793.5) |
| BZF 5mM | 712.9<br>(645.2-780.6) |
| GFB 5mM | 776.2<br>(713.7-838.7) |

Activitats expressades en nmo/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels resultats obtinguts a partir de dues preparacions de citosol diferents.

TAULA I-8. ACIL-CoA HIDROLASA MICROSOMAL

\* 100 µg proteïna / ml

|         | Activitat           | Inhibició |
|---------|---------------------|-----------|
| Control | 86.3<br>(84.5-88.1) | 0%        |
| CFB 1mM | 63.9<br>(62.0-65.9) | 25.9%     |
| CFB 5mM | 30.8<br>(31.9-29.7) | 64.3%     |
| BZF 1mM | 39.0<br>(38.3-39.7) | 54.8%     |
| BZF 5mM | 13.7<br>(13.4-14.0) | 84.1%     |
| GFB 1mM | 14.4<br>(12.4-16.5) | 83.3%     |
| GFB 5mM | 0.6<br>( 0.0- 1.3)  | 99.3%     |

\* 25 µg proteïna /ml

|         | Activitat             | Inhibició |
|---------|-----------------------|-----------|
| Control | 109.1<br>(123.9-94.9) | 0%        |
| CFB 5mM | 33.2<br>( 33.4-33.0)  | 69.5%     |
| BZF 5mM | 4.8<br>( 9.6- 0.0)    | 95.6%     |
| GFB 5mM | 0.0<br>( 0.0- 0.0)    | 100.0%    |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna corresponents a la mitja dels resultats obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents.



## II. NADH-CITOCROM C REDUCTASA

## NADH-CITOCROM C REDUCTASA

L'estudi de l'acció "in vitro" de l'àcid clofibrí, bezafibrat i gemfibrozil sobre les activitats dels enzims de les cadenes de transport electrònic microsomal, NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa, NADPH-citocrom P-450 reductasa i NADH-citocrom c reductasa, ha mostrat que només aquesta darrera resulta afectada: els fàrmacs provats produeixen un increment en l'activitat d'aquest enzim, efecte que és màxim en el cas del gemfibrozil.

En aquest capítol s'intenta elucidar quin és el tipus d'estimulació que produeix el gemfibrozil sobre la NADH-citocrom c reductasa, així com estudiar altres factors que puguin afectar aquesta estimulació.

### 1. Assaig sense microsomes

L'increment d'activitat produït a l'addicionar el gemfibrozil al medi d'incubació, podia ser degut a que aquest simplement catalitzés la transferència d'electrons del NADH al citocrom c, sense que hi participés l'enzim. Per descartar aquesta possibilitat, es va realitzar un assaig incubant el fàrmac, citocrom c i NADH en absència de microsomes. No es va detectar cap canvi en l'absorbància, fet que demostra l'efecte real del fàrmac sobre l'enzim.

### 2. Influència del temps d'incubació

Per assegurar que la variació en el temps d'incubació de la mostra (a 37°C) no feia variar el percentatge d'estimulació que produeix el gemfibrozil, es van provar diferents temps de incubació. Els resultats es mostren en la següent taula:

TAULA II-1. Influència del temps d'incubació

|             | 0 min          | 5 min           | 10 min          | 15 min          |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control     | 537.2<br>±95.0 | 744.5<br>±57.0  | 869.1<br>±28.0  | 884.3<br>±38.3  |
| + GFB 2mM   | 805.3<br>±39.5 | 1063.1<br>±16.7 | 1249.5<br>±44.7 | 1238.7<br>±42.6 |
| Estimulació | 49.9%          | 42.8%           | 43.8%           | 40.1%           |

Els resultats estan expressats en nmol/min/mg de proteïna, i corresponen a la mitja dels valors obtinguts amb tres preparacions microsomals diferents  $\pm$  l'error standard.

S'observa que el percentatge d'estimulació no varia significativament al llarg de tots els temps d'incubació provats. Per tal de que els resultats siguin comparables s'ha utilitzat un temps d'incubació de 5 minuts pels restants assaigs.

### 3. Influència de la quantitat de proteïnes

Per determinar la influència de la quantitat de proteïna microsomal present en el medi d'incubació, es va realitzar un assaig utilitzant diferents concentracions proteiques:

TAULA II-2. Influència de la quantitat de proteïna

| µg/ml | Control                   | + GFB 2mM                 | + GFB 3mM                 |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 150   | 1135.0<br>(1042.1-1228.0) | 1621.5<br>(1660.5-1582.6) | 1764.2<br>(1686.4-1842.1) |
| 100   | 1303.7<br>(1245.4-1362.1) | 1770.7<br>(1712.4-1829.1) | 1790.2<br>(1751.3-1829.1) |
| 50    | 1167.5<br>(1225.9-1109.1) | 1508.0<br>(1537.2-1478.9) | 1770.7<br>(1829.1-1712.4) |
| 25    | 1271.3<br>(1349.1-1193.5) | 1660.5<br>(1660.5-1660.5) | 1855.1<br>(1920.0-1790.2) |

Els resultats (nmol/min/mg proteïna), corresponen a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents.

Es pot observar que pràcticament no hi ha variació en l'activitat enzimàtica, ni tampoc en el percentatge d'estimulació produït pel gemfibrozil (35% per GFB 2 mM, 47% per GFB 3 mM), en tot el rang de concentracions assajat.

#### 4. Corba Concentració Gemfibrozil-Resposta

El gemfibrozil produeix un increment concentració-depenent en l'activitat de la NADH-citocrom c reductasa, tal i com es mostra en la següent taula:

TAULA II-3. Corba Concentració Gemfibrozil-Resposta

|            | Activitat      | Estimulació |
|------------|----------------|-------------|
| Control    | 800.5 ± 53.2   | 0.0%        |
| GFB 0.5 mM | 957.1 ± 118.0  | 14.6%       |
| GFB 1 mM   | 1033.4 ± 98.8  | 28.5%       |
| GFB 1.5 mM | 1147.3 ± 121.5 | 42.6%       |
| GFB 2.5 mM | 1251.1 ± 82.6  | 56.2%       |
| GFB 5 mM   | 1604.9 ± 55.7  | 103.9%      |

Resultats en nmol/min/mg de proteïna (mitja dels valors obtinguts de tres preparacions microsomals diferents ± l'error standard).

Per determinar el valor de l'efecte màxim ( $E_{max}$ ) i la concentració eficaç 50 ( $CE_{50}$ ) del gemfibrozil sobre la NADH-citocrom c reductasa, s'ha utilitzat l'anàlisi de Scatchard (Figura II-1). La recta de regressió obtinguda (coeficient de correlació  $r=-0.904$   $p < 0.05$  per 3 graus de llibertat), permet determinar el valor de la màxima estimulació a partir de la seva intersecció amb l'eix de les x. Aquest valor és d'un 295% d'inducció (assignant un 0% d'estimulació als valors control). El valor de la  $CE_{50}$ , obtingut a partir de la coordenada de l'abscissa corresponent al 50% de la estimulació màxima, és de 9.5 mM.

NADH CITOCROM C REDUCTASA - GEMFIBROZIL

(Representacio de Scatchard)

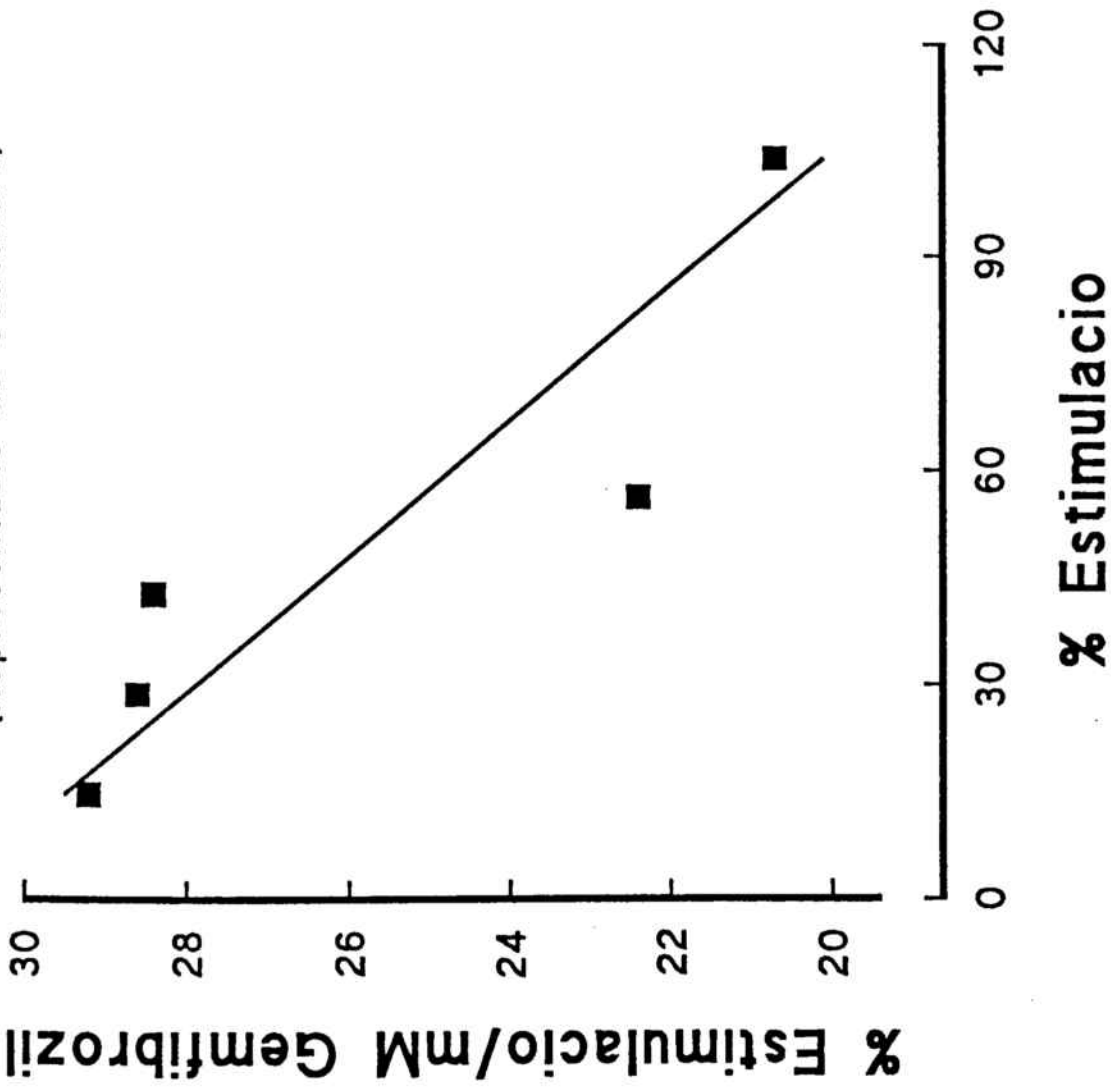


Figura I-1

### 5. Reversibilitat de l'efecte

Per veure si l'efecte del fàrmac sobre la NADH-citocrom c reductasa era o no reversible, es va intentar eliminar aquest del medi d'incubació.

En principi es va pensar que una manera d'aconseguir-ho seria per centrifugació de la mostra, de forma que el fàrmac passés al sobrenedant i aquest fos eliminat. Dos tubs contenint 1 mg de proteïna microsomal per ml, un d'ells sense fàrmac i l'altre contenint gemfibrozil a una concentració de 240  $\mu$ M, es van incubar a 37°C durant 5 minuts i es va determinar l'activitat NADH-citocrom c reductasa. Seguidament, tots dos tubs van ser centrifugats a 45000 rpm durant 30 minuts. Els pellets van ser resuspendes, es va determinar l'activitat, i es va realitzar una segona centrifugació en les mateixes condicions. Els pellets obtinguts es van resuspendre i novament es va determinar la seva activitat. Les concentracions proteïques després de cada resuspensió, van ser determinades pel mètode de Bradford, per tal de corregir possibles pèrdues. Els resultats es mostren en la següent taula:

TAULA II-4. Centrifugació

|           | Abans Centr.              | 1ª Centr.                 | 2ª Centr.                 |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control   | 1003.4<br>(995.0-1011.8)  | 1181.8<br>(1119.5-1244.2) | 1111.3<br>(1102.7-1119.9) |
| + GFB 2mM | 1215.4<br>(1204.9-1225.9) | 1554.5<br>(1602.5-1506.5) | 1513.0<br>(1651.1-1374.9) |

Els resultats estan expressats en nmol/min/mg de proteïna, i són la mitja dels obtinguts a partir de dues preparacions microsomals diferents.

Els resultats mostren que ni tan sols després de dues centrifugacions s'aconsegueix eliminar l'estimulació. Per assegurar que el fàrmac resultés totalment eliminat del medi, les mostres es van dialitzar durant 24 hores a 4°C en front de 1x1 l de tampó fosfat 100 mM + DTT 1 mM (pH=7.4). Es va determinar l'activitat NADH-citocrom c reductasa abans i després de la diàlisi, confirmant-se la desaparició de l'efecte estimulador degut a la total eliminació del gem fibrozil del medi d'incubació, tal i com es mostra en la següent taula. La concentració proteica després de la diàlisi es va determinar pel mètode de Bradford.

TAULA II-5. Diàlisi

|             | Abans diàlisi             | Després diàlisi        |
|-------------|---------------------------|------------------------|
| Control     | 729.7<br>(856.2-603.2)    | 754.6<br>(867.1-642.1) |
| + GFB 2mM   | 1060.4<br>(1070.2-1050.7) | 793.5<br>(867.1-719.9) |
| Estimulació | 45.3%                     | 5.15%                  |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna, corresponents a la mitja dels valors obtinguts de dues preparacions microsomals.



## 6. Estudi de la cinètica de l'estimulació

L'activitat NADH-citocrom c reductasa es va determinar a diferents concentracions de citocrom c, mantenint fixa la concentració de NADH en presència de gemfibrozil a dues concentracions (2 i 3 mM). Els resultats obtinguts van ser els següents:

TAULA II-6. Corba Citocrom c

| Cit C      | Control           | + GFB 2mM          | +GFB 3mM           |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 5 $\mu$ M  | 250.7 $\pm$ 22.9  | 340.8 $\pm$ 11.2   | 404.2 $\pm$ 15.6   |
| 10 $\mu$ M | 483.1 $\pm$ 14.1  | 728.6 $\pm$ 43.7   | 771.8 $\pm$ 9.9    |
| 15 $\mu$ M | 652.9 $\pm$ 47.5  | 938.3 $\pm$ 103.8  | 1063.7 $\pm$ 83.4  |
| 20 $\mu$ M | 774.0 $\pm$ 43.7  | 1026.9 $\pm$ 66.0  | 1202.1 $\pm$ 102.2 |
| 25 $\mu$ M | 851.8 $\pm$ 81.4  | 1208.6 $\pm$ 108.5 | 1270.7 $\pm$ 86.6  |
| 40 $\mu$ M | 1009.6 $\pm$ 45.0 | 1353.4 $\pm$ 126.7 | 1511.3 $\pm$ 104.4 |
| 50 $\mu$ M | 908.0 $\pm$ 46.8  | 1433.4 $\pm$ 130.2 | 1530.7 $\pm$ 135.4 |

Activitats (nmol/min/mg de proteïna), corresponents a la mitja dels valors obtinguts de tres preparacions microsomals diferents  $\pm$  l'error standard.

La representació de Lineweaver i Burk d'aquests resultats es mostra en la figura II-2. Els paràmetres cinètics que se'n deriven vénen indicats en la taula II-7.

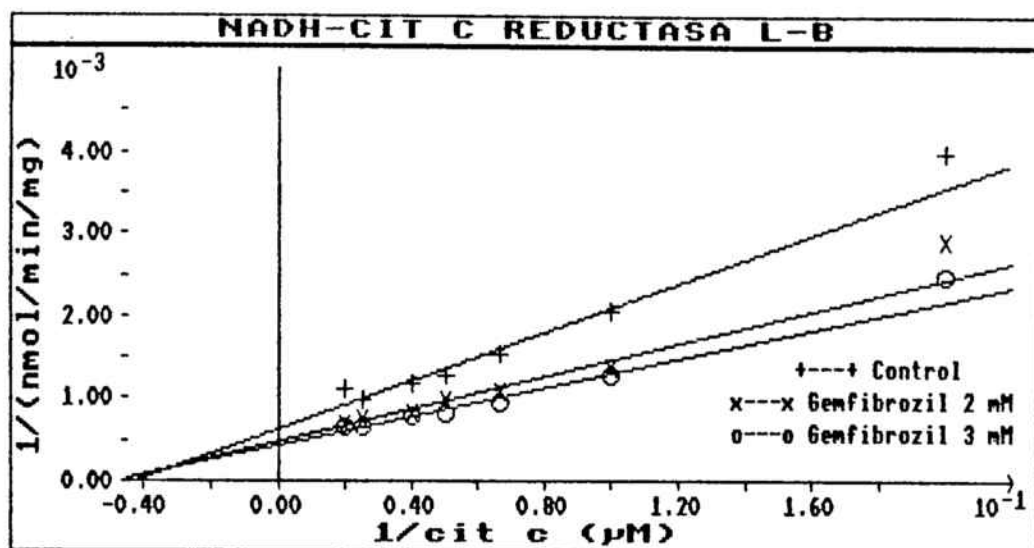


Figura II-2

Representació de Lineweaver i Burk (cit c) variable, (NADH)=120  $\mu\text{M}$

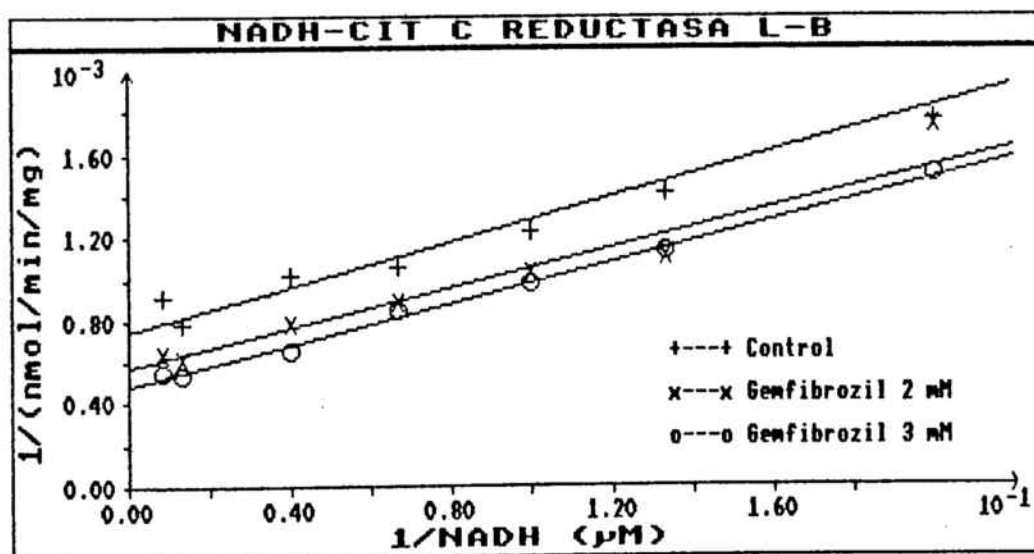


Figura II-3

Representació de Lineweaver i Burk (NADH) variable, (cit c) = 50  $\mu\text{M}$

TAULA II-7. Constants cinètiques aparents pel citocrom c

|               | Control | + GFB 2mM | + GFB 3mM |
|---------------|---------|-----------|-----------|
| $K_m$ ap.     | 21.9    | 21.9      | 20.7      |
| $V_{max}$ ap. | 1515.0  | 2198.0    | 2299.0    |

S'observa que l'addició de gemfibrozil no modifica el valor de la  $K_m$  aparent pel citocrom c, indicant que l'afinitat del sistema pel citocrom c no varia. En canvi, la velocitat màxima aparent s'incrementa marcadament. Quan es manté fixa la concentració de citocrom c i es varia la de NADH, els resultats són totalment diferents:

TAULA II-8. Corba NADH

| NADH        | Control           | + GFB 2mM          | +GFB 3mM           |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 2.5 $\mu$ M | 297.0 $\pm$ 40.8  | 359.0 $\pm$ 47.7   | 296.0 $\pm$ 30.5   |
| 5.0 $\mu$ M | 567.4 $\pm$ 38.8  | 574.0 $\pm$ 61.1   | 666.0 $\pm$ 82.4   |
| 7.5 $\mu$ M | 710.0 $\pm$ 86.0  | 899.0 $\pm$ 148.7  | 882.0 $\pm$ 86.4   |
| 10 $\mu$ M  | 815.6 $\pm$ 68.6  | 966.4 $\pm$ 85.0   | 1023.0 $\pm$ 100.5 |
| 15 $\mu$ M  | 940.5 $\pm$ 78.5  | 1125.0 $\pm$ 103.3 | 1170.7 $\pm$ 72.1  |
| 25 $\mu$ M  | 984.0 $\pm$ 118.2 | 1269.0 $\pm$ 209.3 | 1522.0 $\pm$ 207.5 |
| 75 $\mu$ M  | 1284.5 $\pm$ 86.0 | 1638.0 $\pm$ 103.7 | 1833.0 $\pm$ 202.8 |
| 120 $\mu$ M | 1096.0 $\pm$ 83.8 | 1547.0 $\pm$ 117.2 | 1800.0 $\pm$ 105.8 |

Els resultats (nmol/min/mg) corresponen a la mitja dels valors obtinguts de tres preparacions microsomals  $\pm$  l'error standard.

La representació de Lineweaver i Burk d'aquests resultats (figura II-3) dona línies paral·leles (diferències en les pendents no significatives amb  $p < 0.05$ ). Els paràmetres cinètics obtinguts són els següents:

TAULA II-9. Constants cinètiques aparents pel NADH

|              | Control | + GFB 2mM | + GFB 3mM |
|--------------|---------|-----------|-----------|
| $K_m$ ap     | 5.6     | 9.4       | 10.1      |
| $V_{max}$ ap | 1246.0  | 1808.0    | 2043.0    |

En aquest cas no només s'incrementa la  $V_{max}$ , sinó també la  $K_m$  aparents. Es a dir, que la disminució en la pendent causada per l'increment en la  $V_{max}$  aparent queda compensada per la disminució de l'afinitat.

### III- ACIL-CoA HIDROLASA

### ACIL-CoA HIDROLASA MICROSOMAL

Els resultats de la Tabla I-8 mostren que clofibrat, bezafibrat i gemfibrozil produeixen una marcada inhibició de l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa microsomal "in vitro", sent la seva potència GFB > BZF > CFB. S'han realitzat diferents assaigs per tal d'estudiar en profunditat les característiques d'aquesta inhibició.

#### 1. Influència del temps d'incubació

S'han provat diferents temps d'incubació (a 35°C), per determinar si es produïa alguna variació en els percentatges d'inhibició causats per GFB a una concentració de 0.25 mM.

Els resultats van ser els següents:

TAULA III-1. Acil-CoA hidrolasa microsomal. Influència del temps d'incubació.

| Temps  | Control             | + GFB 0.25mM        | Inhibició |
|--------|---------------------|---------------------|-----------|
| 0 min  | 50.2<br>(47.6-52.9) | 19.7<br>(19.2-20.3) | 60.6%     |
| 5 min  | 62.9<br>(57.0-68.9) | 23.3<br>(20.6-26.0) | 62.9%     |
| 10 min | 67.5<br>(61.7-73.3) | 24.3<br>(22.8-25.8) | 64.0%     |
| 15 min | 66.9<br>(58.9-75.0) | 23.6<br>(23.1-24.2) | 64.6%     |

Activitats expressades en nmol/min/mg de proteïna. Corresponen a la mitja dels resultats obtinguts amb dues preparacions microsomals diferents.

Els resultats de la Taula III-1 mostren que el percentatge d'inhibició no varia a l'augmentar el temps d'incubació de la mostra. En tots els assaigs posteriors s'ha utilitzat un temps d'incubació de 5 minuts.

## 2. Influència de la quantitat de proteïna

Igualment, s'ha estudiat l'efecte que pot tindre la variació en la concentració de proteïnes present en el medi d'incubació sobre el percentatge d'inhibició produït pel gemfibrozil:

TAULA III-2. Acil-CoA hidrolasa microsomal. Influència de la quantitat de proteïna.

| $\mu\text{g/ml}$ | Control             | + GFB 0.05 mM       | + GFB 0.25 mM       |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 100              | 45.8<br>(41.1-47.5) | 31.8<br>(28.3-35.4) | 16.1<br>(14.0-18.3) |
| 75               | 49.4<br>(44.1-54.8) | 35<br>(29.8-40.3)   | 15.4<br>(12.4-18.4) |
| 50               | 43.3<br>(38.0-48.6) | 27.9<br>(24.7-31.2) | 12.1<br>( 7.7-16.5) |
| 25               | 50.1<br>(41.9-58.4) | 31.9<br>(23.1-40.8) | 10.1<br>( 2.2-18.1) |

Resultats (nmol/min/mg proteïna) corresponents a la mitja obtinguda de dues preparacions microsomals diferents.

No s'observa variació en el percentatge d'inhibició causat pel gemfibrozil en cadascuna de les concentracions proteiques assajades: aproximadament 33% a 0.05 mM i 71% a 0.25 mM de gemfibrozil. En totes les proves posteriors s'ha mantingut la mateixa concentració de proteïna microsomal que es venia utilitzant: 100 µg/ml.

### 3. Corbes concentració-resposta

Donat que tots tres fàrmacs mostren elevada potència inhibidora, s'han realitzat corbes concentració-resposta per tots ells, els resultats de les quals es mostren en les següents taules:

TAULA III-3-A. Corba concentració Ac. Clofíbric-Resposta  
Acil-CoA hidrolasa microsomal.

|             | Activitat  | Inhibició |
|-------------|------------|-----------|
| Control     | 51.5 ± 6.4 | 0%        |
| CFB 0.25 mM | 45.4 ± 4.8 | 11.9%     |
| CFB 0.5 mM  | 40.9 ± 6.6 | 20.6%     |
| CFB 0.75 mM | 39.3 ± 6.3 | 23.6%     |
| CFB 1 mM    | 35.2 ± 5.9 | 31.5%     |
| CFB 2 mM    | 30.5 ± 4.0 | 40.8%     |
| CFB 4 mM    | 23.7 ± 2.9 | 53.9%     |
| CFB 5 mM    | 18.5 ± 6.4 | 64.0%     |

Resultats (nmol/min/mg prot) corresponents a la mitja de les activitats de tres preparacions microsomals diferents ± l'error standard.



TAULA III-3-B. Corba concentració Bezafibrat-Resposta Acil-CoA hidrolasa microsomal.

|             | Activitat        | Inhibició |
|-------------|------------------|-----------|
| Control     | 47.8 ± 5.8       | 0%        |
| BZF 0.1 mM  | 42.9 ± 4.4       | 6.2%      |
| BZF 0.25 mM | 35.9 ± 4.9       | 21.5%     |
| BZF 0.5 mM  | 31.1 ± 2.5       | 32.0%     |
| BZF 0.75 mM | 24.5 ± 0.8       | 46.4%     |
| BZF 1 mM    | 20.5 ± 0.4       | 55.1%     |
| BZF 2 mM    | 15.7 (15.2-16.2) | 65.6%     |
| BZF 5 mM    | 8.6 ± 0.5        | 81.1%     |

Les activitats estan expressades en nmol/min/mg de proteïna i corresponen a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues o tres preparacions microsomals diferents ± l'error standard.

TAULA III-3-C. Corba Concentració Gemfibrozil-Resposta  
Acil-CoA hidrolasa microsomal.

|             | Activitat        | Inhibició |
|-------------|------------------|-----------|
| Control     | 47.8 ± 5.8       | 0%        |
| GFB 0.05 mM | 29.4 (29.2-29.6) | 35.6%     |
| GFB 0.1 mM  | 29.6 ± 5.3       | 35.3%     |
| GFB 0.25 mM | 19.1 ± 4.4       | 58.2%     |
| GFB 0.35 mM | 16.5 (17.3-15.6) | 64.0%     |
| GFB 0.5 mM  | 9.8 ± 0.7        | 78.5%     |
| GFB 0.75 mM | 6.0 ± 1.5        | 86.8%     |
| GFB 1 mM    | 3.6 ± 0.4        | 92.1%     |
| GFB 5 mM    | 0.06 ± 0.06      | 99.9%     |

Resultats en nmol/min/mg de proteïna (mitja dels obtinguts amb dues o tres preparacions microsomals ± error standard.

S'observa que la inhibició produïda pels tres fàrmacs sobre la acil-CoA hidrolasa microsomal és concentració dependent.

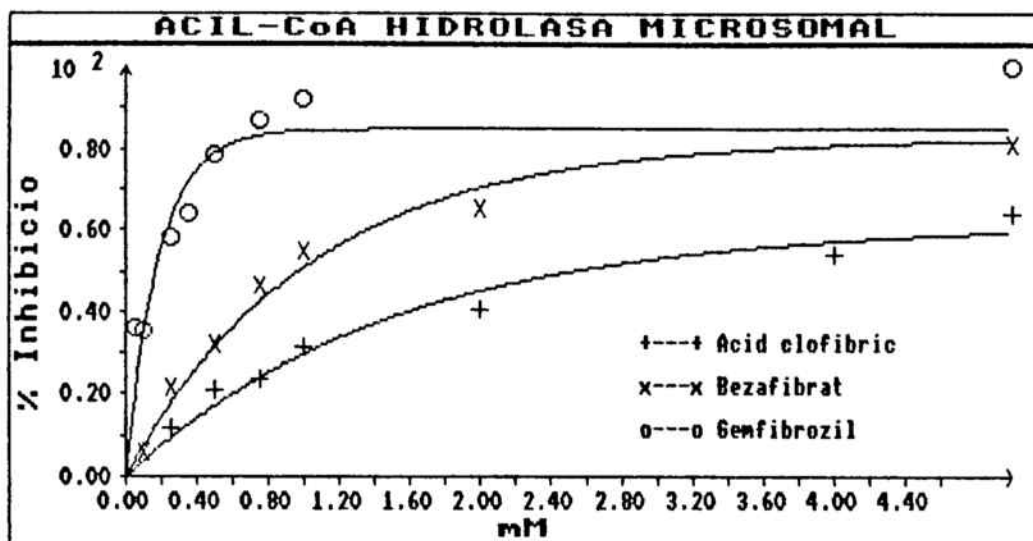


Figura III-1  
Corbes concentració-resposta

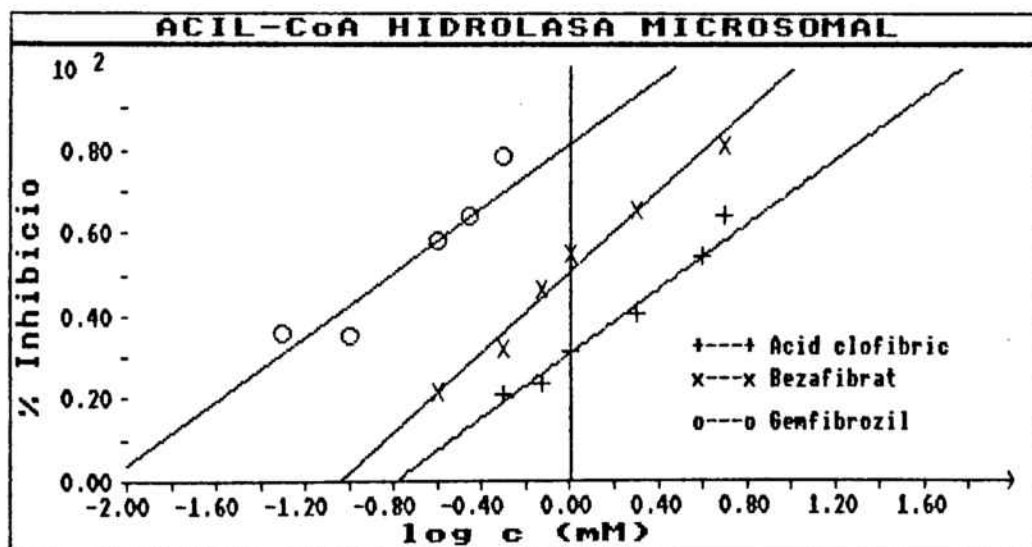


Figura III-2  
Corbes concentració-resposta  
(representació semilogarítmica)

Per determinar la concentració inhibidora 50 ( $CI_{50}$ ) en cada cas, s'han representat els logaritmes de la concentració de fàrmac en front del percentatge d'inhibició corresponent (Figura III-2).

Les  $CI_{50}$  obtingudes han estat :

Ac. Clofibrat: 2.85 mM (2.27-3.59)\*

Bezafibrat: 0.97 mM (0.80-1.19)

Gemfibrozil: 0.15 mM (0.09-0.25)

\* Intervals de confiança per  $p < 0.05$

En l'assaig de paral·lelisme realitzat s'ha vist que les tres rectes són paral·leles, amb un pendent comú de 44.477.

La potència relativa del gemfibrozil respecte al clofibrat i al bezafibrat és respectivament de 18.6 i 6.6.

#### 4. Reversibilitat de l'efecte

Per determinar si l'efecte inhibidor del gemfibrozil desapareix a l'eliminar el fàrmac del medi d'incubació, dos tubs, contenint cadascun 1 mg de proteïna per ml (un d'ells contenint a més gemfibrozil en quantitat suficient perquè la seva concentració final en la cubeta fos de 0.15 mM), van ser centrifugats a 45000 rpm durant 30 minuts. L'activitat acil-CoA hidrolasa va ser determinada per cada tub abans i després de la centrifugació, obtenint-se els següents resultats:

TAULA III-4. Acil-CoA hidrolasa microsomal.Centrifugació

|               | Abans Centr.     | Després Centr.   |
|---------------|------------------|------------------|
| Control       | 53.1 (47.9-58.4) | 61.0 (59.4-62.7) |
| + GFB 0.15 mM | 24.7 (23.1-26.4) | 64.5 (53.0-76.0) |
| Inhibició     | 53.4%            | 0%               |

Els resultats (nmol/min/mg proteïna) corresponen a la mitja dels valors obtinguts de dues preparacions microsomals diferents.

La reversibilitat de l'efecte inhibitor del gemfibrozil sobre l'acil-CoA hidrolasa microsomal queda així demostrada, doncs al centrifugar, el fàrmac queda en el sobrenedant, i al rentar el pellet aquest s'elimina.

##### 5. Cinètica de la inhibició per gemfibrozil

Es va realitzar un assaig variant la concentració de substrat (palmitoil-CoA) en presència de gemfibrozil 0.25 i 0.05 mM. Els resultats es mostren en la següent taula:

TAULA III-5. Acil-CoA hidrolasa microsomal.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA (40  $\mu$ M)

| Pal-CoA      | Control        | + GFB 0.05mM   | + GFB 0.25mM   |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 10 $\mu$ M   | 6.6 $\pm$ 0.3  | 3.5 $\pm$ 0.8  | 0.3 $\pm$ 0.4  |
| 15 $\mu$ M   | 11.1 $\pm$ 1.2 | 9.6 $\pm$ 1.2  | 2.9 $\pm$ 0.5  |
| 17.5 $\mu$ M | 16.3 $\pm$ 1.6 | 13.8 $\pm$ 0.5 | 5.2 $\pm$ 0.6  |
| 20 $\mu$ M   | 20.7 $\pm$ 0.3 | 16.1 $\pm$ 0.4 | 6.4 $\pm$ 1.3  |
| 25 $\mu$ M   | 26.0 $\pm$ 1.6 | 16.5 $\pm$ 0.2 | 7.3 $\pm$ 1.0  |
| 30 $\mu$ M   | 31.0 $\pm$ 0.5 | 23.0 $\pm$ 1.4 | 9.9 $\pm$ 0.3  |
| 40 $\mu$ M   | 41.5 $\pm$ 1.6 | 30.0 $\pm$ 1.3 | 14.0 $\pm$ 1.7 |

Resultats expressats en nmol/min/mg proteïna, corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de tres preparacions microsomals diferents

Les dades obtingudes no es van poder ajustar a l'equació de Michaelis-Menten. Degut a això, es van realitzar diversos assaigs per determinar la influència de la BSA sobre la cinètica d'aquest enzim, donada la possible interferència de la BSA amb l'enzim o amb els fàrmacs, doncs tots dos s'uneixen en elevada proporció a l'albúmina.

En primer lloc, es va comprovar que la linealitat entre concentració proteica i activitat es manté fins a 200 µg de proteïna/ml quan no hi ha BSA en el medi d'incubació (Figura III-2).

Utilitzant una concentració de 100 µg de proteïna microsomal per ml, es va determinar l'activitat acil-CoA hidrolasa a diferents concentracions de substrat, obtenint-se els següents resultats:

TAULA III-6. Acil-CoA hidrolasa microsomal.  
Corba Palmitoil-CoA en absència de BSA.

| Pal-CoA | Activitat  |
|---------|------------|
| 2.5 µM  | 2.8 ± 0.6  |
| 5 µM    | 8.5 ± 0.6  |
| 10 µM   | 17.7 ± 0.9 |
| 15 µM   | 25.4 ± 1.0 |
| 20 µM   | 33.0 ± 3.5 |
| 30 µM   | 37.8 ± 2.8 |
| 40 µM   | 45.1 ± 5.2 |
| 50 µM   | 43.7 ± 4.9 |
| 60 µM   | 41.5 ± 4.8 |
| 70 µM   | 34.5 ± 5.1 |
| 90 µM   | 28.0 ± 3.4 |
| 100 µM  | 26.5 ± 3.4 |
| 150 µM  | 19.4 ± 1.3 |
| 200 µM  | 15.0 ± 1.7 |

Resultats (nmol/min/mg proteïna) corresponents a la mitja dels valors de tres preparacions microsomals diferents ± l'error standard.

De les dades obtingudes es desprèn que, almenys en les nostres condicions d'assaig, l'activitat acil-CoA hidrolasa augmenta a mesura que s'incrementa la concentració de substrat, fins arribar al màxim a la concentració de 40  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA. A concentracions més altes l'activitat baixa.

Prenent 40  $\mu\text{M}$  com a concentració òptima de palmitoil-CoA, es va mesurar l'activitat amb diferents quantitats de BSA per tal d'obtindre relacions variables entre les concentracions de palmitoil-Coa i BSA. Els resultats van ser els següents:

TAULA III-7. Acil-CoA hidrolasa microsomal.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA a relació variable.

| nmol Pal-CoA/<br>mg BSA | Activitat      |
|-------------------------|----------------|
| 40                      | 22.2 $\pm$ 3.3 |
| 60                      | 41.5 $\pm$ 5.4 |
| 80                      | 55.4 $\pm$ 5.6 |
| 100                     | 64.7 $\pm$ 7.2 |
| 120                     | 61.7 $\pm$ 2.8 |
| 140                     | 65.5 $\pm$ 4.5 |
| 160                     | 64.8 $\pm$ 4.3 |
| 180                     | 63.0 $\pm$ 5.4 |
| 200                     | 63.1 $\pm$ 6.0 |
| 220                     | 64.0 $\pm$ 5.9 |
| 240                     | 60.6 $\pm$ 4.2 |
| 260                     | 60.0 $\pm$ 6.7 |
| 360                     | 57.9 $\pm$ 6.0 |

Els resultats (mitja dels valors obtinguts de tres preparacions microsomals diferents  $\pm$  error standard) vénen expressats en nmol/min/mg de proteïna.

L'activitat enzimàtica augmenta fins arribar al màxim a 100 nmols de Pal-CoA/mg de BSA, i es manté al llarg de tot el rang de relacions provat, si bé s'observa una lleugera disminució d'activitat a les relacions més altes. Donat que en els assaigs anteriors s'havia utilitzat sempre una relació de 120 nmol de Pal-Coa / mg de BSA, es va estudiar la variació de l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa al variar la concentració de palmitoil-CoA mantenint fixa la relació esmentada. Els resultats van ser:

TAULA III-8. Acil-CoA hidrolasa microsomal.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA (120 nmol Pal-CoA/mg BSA).

| Pal-CoA     | Activitat        |
|-------------|------------------|
| 2.5 $\mu$ M | 2.2 (1.9-2.5)    |
| 5 $\mu$ M   | 5.2 (5.2-5.2)    |
| 10 $\mu$ M  | 12.0 (11.8-12.3) |
| 15 $\mu$ M  | 21.4 (20.1-22.8) |
| 20 $\mu$ M  | 26.9 (24.7-29.1) |
| 30 $\mu$ M  | 37.7 (36.4-39.1) |
| 40 $\mu$ M  | 45.1 (44.6-45.7) |
| 50 $\mu$ M  | 48.7 (47.4-50.1) |
| 60 $\mu$ M  | 50.4 (49.0-51.8) |
| 70 $\mu$ M  | 47.4 (45.2-49.6) |
| 80 $\mu$ M  | 46.2 (45.7-46.8) |
| 160 $\mu$ M | 36.3 (38.0-34.7) |

Els resultats estan expressats en nmol/min/mg de proteïna, i corresponen a la mitja dels resultats obtinguts de tres preparacions microsomals diferents.



Dels resultats es pot concloure que si bé el màxim real es situa a 60  $\mu\text{M}$  de Pal-CoA, 40  $\mu\text{M}$  és una concentració òptima per treballar-hi, doncs la variació en l'activitat a l'utilitzar una o altra concentració és molt petita ( 5.3 nmol/min/mg de proteïna ).

Per comprovar que tampoc varia el percentatge d'inhibició si es treballa sense BSA, es va assajar l'activitat en presència de tres concentracions diferents de cada fàrmac. Els resultats de la següent taula mostren que els percentatges d'inhibició són pràcticament els mateixos que quan es treballa amb BSA (comparar la següent taula amb les taules III-3 A, B i C):

TAULA III-9. Acil-CoA hidrolasa microsomal.  
Efecte dels fàrmacs en absència de BSA.

|            | Activitat      | Inhibició |
|------------|----------------|-----------|
| Control    | 46.2 $\pm$ 6.5 | 0%        |
| CFB 0.5mM  | 38.7 $\pm$ 3.3 | 16.2%     |
| CFB 2mM    | 28.7 $\pm$ 2.3 | 37.7%     |
| CFB 5 mM   | 18.3 $\pm$ 1.1 | 60.4%     |
| BZF 0.5mM  | 29.3 $\pm$ 3.2 | 36.5%     |
| BZF 1mM    | 19.2 $\pm$ 1.9 | 58.3%     |
| BZF 5mM    | 6.9 $\pm$ 0.6  | 85.0%     |
| GFB 0.05mM | 36.1 $\pm$ 3.2 | 21.7%     |
| GFB 0.25mM | 22.1 $\pm$ 1.0 | 52.0%     |
| GFB 0.5mM  | 14.3 $\pm$ 1.1 | 69.0%     |

Els resultats corresponen a la mitja dels obtinguts de tres preparacions microsomals  $\pm$  l'error standard, i estan expressats en nmol/min/mg de proteïna.

En cap dels assaigs realitzats, amb o sense BSA en el medi d'incubació, no es van poder ajustar els resultats a l'equació de Michaelis-Menten.

Seguidament, es va procedir a l'estudi de l'efecte de l'àcid clofibrí, bezafibrat i gemfibrozil sobre altres acil-CoA hidrolases cel·lulars de localització mitocondrial i citosòlica.

### ACIL-CoA HIDROLASA MITOCONDRIAL

A més de l'acil-CoA hidrolasa microsomal hepàtica existeixen acil-CoA hidrolases diferents amb altres localitzacions dins l'hepatòcit: mitocondrial i citosòlica. En aquest apartat s'estudia l'efecte de l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil sobre l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial hepàtica.

#### 1. Efecte "in vitro" de l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil

Els resultats de l'estudi preliminar de l'efecte dels tres fàrmacs esmentats sobre l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial, es mostren en la següent taula:

TAULA III-10. Efecte dels fàrmacs sobre l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial

|            | Activitat        | Inhibició |
|------------|------------------|-----------|
| Control    | 32.2 (30.0-34.5) | 0%        |
| CFB 1 mM   | 20.0 (16.5-23.6) | 37.8%     |
| CFB 5 mM   | 7.4 ( 3.8-11.0)  | 77.0%     |
| BZF 1 mM   | 11.5 ( 7.7-15.4) | 64.2%     |
| BZF 5 mM   | 2.8 ( 1.1- 4.6)  | 91.3%     |
| GFB 0.2 mM | 12.9 (12.1-13.7) | 60.0%     |
| GFB 1 mM   | 0.3 ( 0.0- 0.5)  | 99.1%     |

Els resultats són la mitja dels obtinguts de dues preparacions mitocondrials, i estan expressats en nmol/min/mg de proteïna.

S'observa que aquests resultats són força similars als obtinguts amb l'enzim microsomal, si bé en aquest cas les activitats control són més baixes, fet que concorda amb les referències bibliogràfiques existents, i els percentatges d'inhibició lleugerament més alts.

## 2. Corbes concentració-resposta

Les dades obtingudes a l'incubar la mostra amb diferents concentracions dels fàrmacs assajats es mostren en les següents taules:

TAULA III-11-A. Corba concentració-Resposta Ac. clofibríc. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.

|            | Activitat        | Inhibició |
|------------|------------------|-----------|
| Control    | 25.6 (22.5-28.8) | 0%        |
| CFB 0.25mM | 23.1 (20.9-25.3) | 9.7%      |
| CFB 0.5 mM | 19.7 (17.0-22.5) | 22.8%     |
| CFB 0.75mM | 16.7 (14.8-18.7) | 34.7%     |
| CFB 1 mM   | 14.5 (12.6-16.5) | 43.1%     |
| CFB 2 mM   | 10.9 ( 9.3-12.6) | 57.2%     |
| CFB 4 mM   | 7.6 ( 7.1- 8.2)  | 70.1%     |
| CFB 5 mM   | 5.4 ( 4.9- 6.0)  | 79.0%     |

Els resultats (nmol/min/mg de proteïna) corresponen a la mitja dels valors obtinguts a partir de dues preparacions mitocondrials diferents.

TAULA III-11-B. Corba Concentració-Resposta Bezafibrat. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.

|            | Activitat   | Inhibició |
|------------|-------------|-----------|
| Control    | 37.0 ± 10.5 | 0%        |
| BZF 0.1 mM | 30.1 ± 6.7  | 18.6%     |
| BZF 0.25mM | 25.7 ± 7.6  | 30.5%     |
| BZF 0.5 mM | 23.8 ± 7.2  | 35.6%     |
| BZF 0.75mM | 16.4 ± 4.4  | 55.5%     |
| BZF 1 mM   | 12.6 ± 4.0  | 65.8%     |
| BZF 2 mM   | 8.1 ± 2.7   | 78.1%     |
| BZF 5 mM   | 2.3 ± 1.0   | 93.6%     |

Activitats en nmol/min/mg de proteïna, corresponents a la mitja dels valors de tres preparacions mitocondrials ± l'error standard.

TAULA III-11-C. Corba Concentració-Resposta Gemfibrozil. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial

|            | Activitat        | Inhibició |
|------------|------------------|-----------|
| Control    | 34.8 (30.0-39.7) | 0%        |
| GFB 0.05mM | 25.0 (20.9-29.2) | 28.1%     |
| GFB 0.1 mM | 20.0 (15.4-24.7) | 42.5%     |
| GFB 0.25mM | 11.0 ( 7.7-14.3) | 68.3%     |
| GFB 0.35mM | 9.6 ( 5.5-13.7)  | 72.4%     |
| GFB 0.5 mM | 6.6 ( 3.3- 9.9)  | 81.0%     |
| GFB 0.75mM | 3.7 ( 1.9- 5.5)  | 89.3%     |
| GFB 1 mM   | 2.2 ( 1.1- 3.3)  | 93.6%     |
| GFB 5 mM   | 0.0 ( 0.0- 0.0)  | 100.0%    |

Activitats (nmol/min/mg) mitja dels valors de dues preparacions mitocondrials.

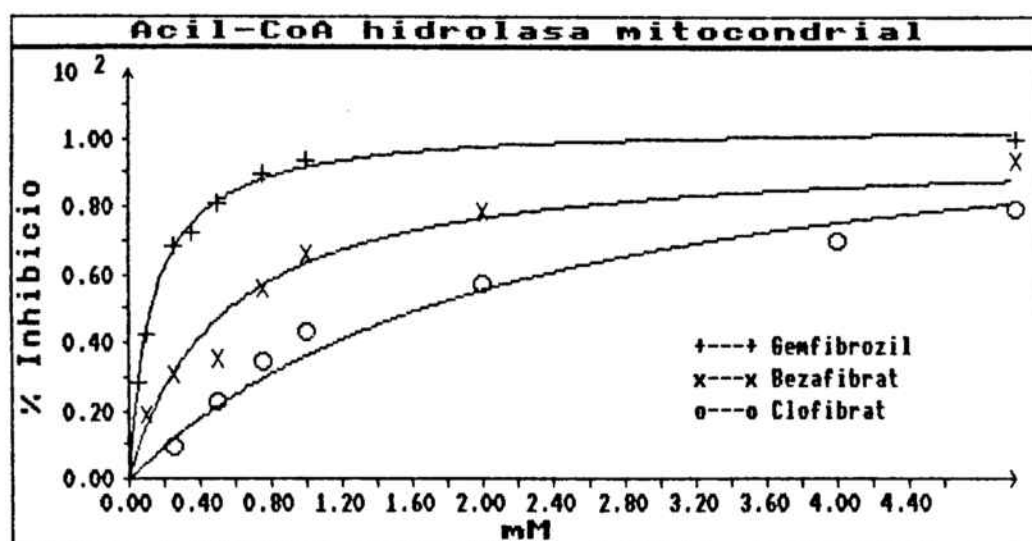


Figura III-3  
Corbes concentració-resposta

### 3. Estudi de la influència de la BSA

A l'igual que en el cas de l'enzim microsomal, es va realitzar en primer lloc un estudi de les condicions idònies per a la valoració de l'activitat enzimàtica.

S'ha comprovat que la linealitat entre la concentració de proteïna mitocondrial i l'activitat de l'enzim es manté fins a 200 µg/ml de proteïna quan no hi ha BSA en el medi d'incubació.

Els resultats permeten treballar a la mateixa concentració que s'havia vingut utilitzant (100 µg/ml), i en aquestes condicions es va realitzar un assaig determinant l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial a diferents concentracions de substrat, sense addicionar BSA.

Els resultats obtinguts es mostren en la següent taula:

TAULA III-12. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.  
Corba Palmitoil-CoA en absència de BSA.

| Pal-CoA     | Activitat      |
|-------------|----------------|
| 5 $\mu$ M   | 4.8 $\pm$ 1.4  |
| 10 $\mu$ M  | 9.6 $\pm$ 1.2  |
| 15 $\mu$ M  | 16.6 $\pm$ 3.2 |
| 20 $\mu$ M  | 20.1 $\pm$ 4.6 |
| 30 $\mu$ M  | 26.9 $\pm$ 6.8 |
| 40 $\mu$ M  | 28.9 $\pm$ 7.6 |
| 50 $\mu$ M  | 25.5 $\pm$ 7.5 |
| 60 $\mu$ M  | 24.2 $\pm$ 7.3 |
| 70 $\mu$ M  | 22.0 $\pm$ 6.4 |
| 100 $\mu$ M | 16.3 $\pm$ 4.4 |
| 150 $\mu$ M | 11.9 $\pm$ 2.7 |
| 200 $\mu$ M | 9.5 $\pm$ 1.8  |

Resultats expressats en nmol/min/mg de proteïna, corresponents a la mitja obtinguda dels valors de tres preparacions mitocondrials.

S'observa que a l'igual que succeïa amb l'enzim microsomal, l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial presenta el màxim d'activitat a 40  $\mu$ M de palmitoil-CoA. A concentracions més altes que aquesta, l'activitat comença a disminuir.



Per tal de determinar quina és la relació de concentracions Pal-CoA/BSA òptima per donar la màxima activitat s'ha treballat amb diferents quantitats de BSA, mantenint fixa la concentració de palmitoil-CoA (40  $\mu$ M)

TAULA III-13. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA a relació variable.

| nmol Pal-CoA/<br>mg BSA | Activitat       |
|-------------------------|-----------------|
| 40                      | 16.6 $\pm$ 4.2  |
| 60                      | 31.4 $\pm$ 6.8  |
| 80                      | 37.2 $\pm$ 10.5 |
| 100                     | 43.1 $\pm$ 10.2 |
| 120                     | 42.5 $\pm$ 10.0 |
| 140                     | 42.4 $\pm$ 10.5 |
| 160                     | 40.0 $\pm$ 9.7  |
| 180                     | 37.8 $\pm$ 8.5  |
| 200                     | 37.4 $\pm$ 10.0 |
| 220                     | 37.8 $\pm$ 9.5  |
| 240                     | 37.6 $\pm$ 11.5 |
| 260                     | 33.2 $\pm$ 8.1  |
| 360                     | 34.3 $\pm$ 9.2  |

Els resultats (nmol/min/mg de proteïna) són la mitja dels obtinguts a partir de tres preparacions mitocondrials diferents  $\pm$  l'error standard.

El màxim d'activitat es troba entre 100 i 160 nmol Pal-CoA/mg de BSA. S'ha escollit la relació de 120 nmol Pal-CoA / mg de BSA, doncs és la relació a la que hem treballat habitualment, per veure quina és l'activitat enzimàtica mantenint-la fixa i variant la concentració de substrat. Els resultats van ser els següents:

TAULA III-14. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA (120 nmol Pal-CoA/mg BSA)

| Pal-CoA     | Activitat        |
|-------------|------------------|
| 5 $\mu$ M   | 3.4 ( 4.4- 2.4)  |
| 10 $\mu$ M  | 10.4 (11.2- 9.6) |
| 15 $\mu$ M  | 14.5 (15.4-13.7) |
| 20 $\mu$ M  | 19.2 (18.1-20.3) |
| 30 $\mu$ M  | 24.2 (22.0-26.4) |
| 40 $\mu$ M  | 26.2 (22.6-29.8) |
| 60 $\mu$ M  | 27.5 (24.2-30.8) |
| 70 $\mu$ M  | 25.3 (20.9-29.7) |
| 80 $\mu$ M  | 25.5 (20.3-30.2) |
| 160 $\mu$ M | 21.7 (16.0-27.5) |

Les activitats estan expressades en nmol/min/mg de proteïna. Corresponen a la mitja dels valors obtinguts de dues preparacions mitocondrials diferents.

Cap d'aquests resultats (Taules III-11 i III-13) es va ajustar a l'equació de Michaelis i Menten, resultant impossible l'estudi de la cinètica de la inhibició.

Finalment, es va determinar l'efecte dels fàrmacs sobre l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial en absència de BSA. Els resultats es mostren en aquesta taula:

TAULA III-15. Acil-CoA hidrolasa mitocondrial.  
Efecte dels fàrmacs en absència de BSA.

|             | Activitat  | Inhibició |
|-------------|------------|-----------|
| Control     | 27.7 ± 8.5 | 0.0%      |
| CFB 0.5 mM  | 24.4 ± 7.3 | 11.9%     |
| CFB 2 mM    | 17.3 ± 5.0 | 37.5%     |
| CFB 5 mM    | 12.0 ± 3.5 | 56.4%     |
| BZF 0.5 mM  | 18.7 ± 6.2 | 35.2%     |
| BZF 1 mM    | 12.8 ± 4.3 | 53.6%     |
| BZF 5 mM    | 5.5 ± 2.0  | 79.9%     |
| GFB 0.05 mM | 22.6 ± 7.2 | 18.4%     |
| GFB 0.25 mM | 14.6 ± 4.3 | 47.3%     |
| GFB 0.5 mM  | 9.9 ± 3.0  | 64.2%     |

Activitats (nmol/min/mg de proteïna) corresponents a la mitja dels valors obtinguts a partir de tres preparacions mitocondrials diferents.

Donat que els percentatges d'inhibició obtinguts en presència i en absència de BSA en el medi d'incubació són molt similars (comparar taula III-15 amb taules III-11 A, B i C), es va procedir a la determinació dels valors de les  $CI_{50}$  a partir dels resultats obtinguts treballant amb BSA.

Per determinar les  $CI_{50}$  per cada fàrmac s'han representat els logaritmes de les concentracions de fàrmac en front del percentatge d'inhibició que produeixen (Figura III-4).

Les  $CI_{50}$  obtingudes són:

Clofibrat: 1.49 mM (1.48-1.5)

Bezafibrat: 0.58 mM (0.4-0.85)

Gemfibrozil: 0.13 mM (0.11-0.15)

Intervals de confiança per  $p < 0.05$

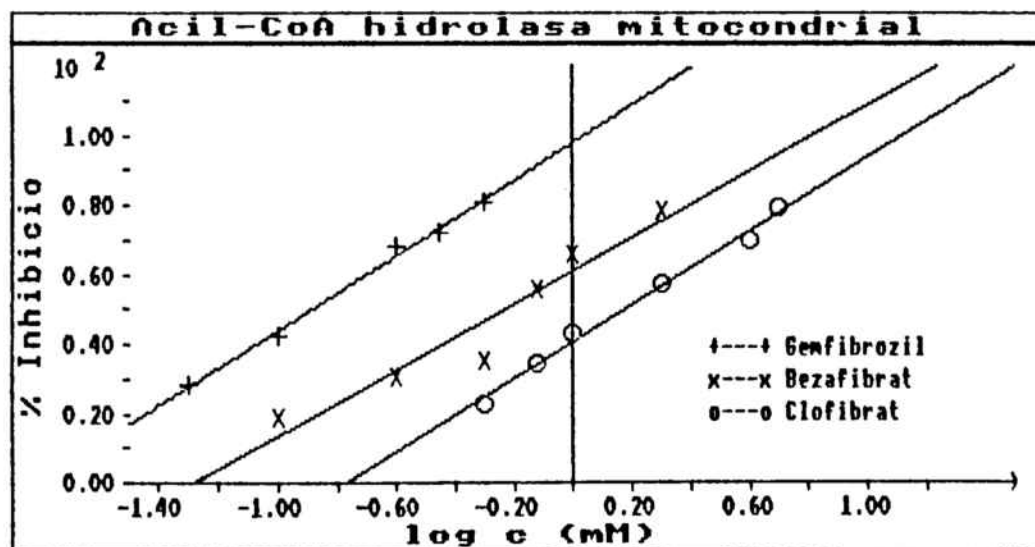


Figura III-4

Corbes concentració-resposta  
(representació semilogàrfmica)

En l'assaig de paral·lelisme realitzat, s'ha vist que les tres rectes són paral·leles, amb un pendent comú de 53.093. El gemfibrozil és 4.5 vegades més potent que el bezafibrat, i 11.6 vegades més que el clofibrat.

## ACIL-CoA HIDROLASA CITOSOLICA

L'acil-CoA hidrolasa citosòlica de fetge té una activitat molt baixa encara que aquesta s'indueix molt al tractar l'animal amb clofibrat. En canvi l'acil-CoA hidrolasa del citosol de cervell té una activitat molt més alta en animals no tractats, per això es va escollir aquest òrgan per fer l'estudi de l'enzim citosòlic.

### 1. Influència de l'albumina

En primer lloc, a l'igual que pels dos enzims anteriors, es va estudiar la influència de l'albumina sobre la cinètica enzimàtica. En la figura III-6 es mostra que l'activitat de l'enzim és lineal amb la concentració de proteïna citosòlica fins a 200  $\mu\text{g/ml}$ . Per continuar amb la pauta establerta es va escollir la concentració de 100  $\mu\text{g/ml}$  pels assaigs posteriors. A aquesta concentració, es va mesurar l'activitat de l'enzim amb concentracions creixents de substrat, en absència de BSA. Es van obtenir els següents resultats:

TAULA III-16. Acil-CoA hidrolasa citosòlica.  
Corba Palmitoil-CoA en absència de BSA.

| Pal-CoA     | Activitat           |
|-------------|---------------------|
| 2.5 $\mu$ M | 43.5 ( 41.3- 45.7)  |
| 5 $\mu$ M   | 87.9 ( 90.4- 85.4)  |
| 10 $\mu$ M  | 134.2 (133.4-135.0) |
| 15 $\mu$ M  | 176.2 (177.1-175.3) |
| 20 $\mu$ M  | 204.0 (205.1-202.9) |
| 30 $\mu$ M  | 213.1 (203.5-222.8) |
| 40 $\mu$ M  | 238.5 (235.5-241.5) |
| 50 $\mu$ M  | 247.6 (250.4-244.8) |
| 60 $\mu$ M  | 239.8 (240.4-239.3) |
| 70 $\mu$ M  | 228.8 (212.8-244.8) |
| 100 $\mu$ M | 232.7 (230.5-234.9) |
| 150 $\mu$ M | 217.7 (220.5-215.0) |

Resultats (nmol/min/mg proteïna) corresponents a la mitja dels obtinguts de dues preparacions de citosol diferents.

Els resultats es van poder ajustar a l'equació de Michaelis i Menten, tal i com es mostra en la figura III-5. El màxim d'activitat es troba a 50  $\mu$ M de palmitoil-CoA, si bé aquest màxim es troba molt proper al resultat que s'obté amb 40  $\mu$ M. Utilitzant 40  $\mu$ M de palmitoil-CoA, per tal que els resultats fóssin comparables als obtinguts amb els altres dos enzims, es va determinar l'activitat de l'enzim en presència de BSA, de forma que la relació entre les concentracions de palmitoil-CoA i BSA fos variable. Els resultats obtinguts es mostren en la següent taula:

TAULA III-17. Acil-CoA hidrolasa citosòlica.  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA a relació variable

| nmolPal-CoA/<br>mg BSA | Activitat           |
|------------------------|---------------------|
| 40                     | 106.4 ( 90.9-122.4) |
| 60                     | 157.1 (153.8-160.4) |
| 80                     | 184.4 (181.9-186.9) |
| 100                    | 196.8 (188.5-205.1) |
| 120                    | 224.9 (223.3-226.6) |
| 140                    | 223.3 (216.7-230.0) |
| 160                    | 230.0 (231.6-228.3) |
| 180                    | 218.3 (206.7-230.0) |
| 200                    | 224.1 (216.7-231.5) |
| 220                    | 222.5 (215.0-230.0) |
| 240                    | 222.4 (231.6-213.3) |
| 260                    | 230.0 (230.0-230.0) |
| 360                    | 249.5 (248.1-251.4) |

Activitats expressades en nmol/min/mg prot (mitja dels resultats de dues preparacions de citosol)

Dels resultats es desprèn que l'activitat augmenta fins arribar a uns 225-230 nmol/min/mg prot, valor que es manté des de 120 fins a 260 nmol Pal-CoA/mg BSA. A la relació de 360 s'observa un augment de l'activitat, que es pot explicar pel fet que hi ha molt poca quantitat de BSA en relació a la concentració de substrat, i en aquest enzim l'activitat tendeix a augmentar quan no hi ha BSA en el medi.

Per determinar l'activitat de l'enzim a diferents concentracions de substrat en presència de BSA es va escollir la relació de 120 nmol de Pal-CoA/mg de BSA, per trobar-se dins del màxim i ser la mateixa relació utilitzada en l'estudi de les altres hidrolases. Els resultats es mostren en la següent taula:

TAULA III-18. Acil-CoA hidrolasa citosòlica  
Corba Palmitoil-CoA amb BSA (120 nmol Pal-CoA/mg BSA).

| Pal-CoA     | Activitat           |
|-------------|---------------------|
| 2.5 $\mu$ M | 40.1 ( 41.9- 38.3)  |
| 5 $\mu$ M   | 77.6 ( 79.3- 76.0)  |
| 10 $\mu$ M  | 124.6 (126.8-122.4) |
| 15 $\mu$ M  | 154.9 (154.4-155.5) |
| 20 $\mu$ M  | 178.6 (178.6-178.6) |
| 30 $\mu$ M  | 197.6 (201.8-193.5) |
| 40 $\mu$ M  | 228.3 (234.9-221.7) |
| 50 $\mu$ M  | 223.2 (233.2-213.3) |
| 60 $\mu$ M  | 215.8 (231.6-200.1) |
| 70 $\mu$ M  | 228.3 (231.6-225.0) |
| 80 $\mu$ M  | 215.0 (218.3-211.7) |
| 160 $\mu$ M | 187.7 (186.9-188.6) |

Resultats (nmol/min/mg de proteïna citosòlica) corresponents a la mitja dels obtinguts de dues preparacions de citosol diferents.



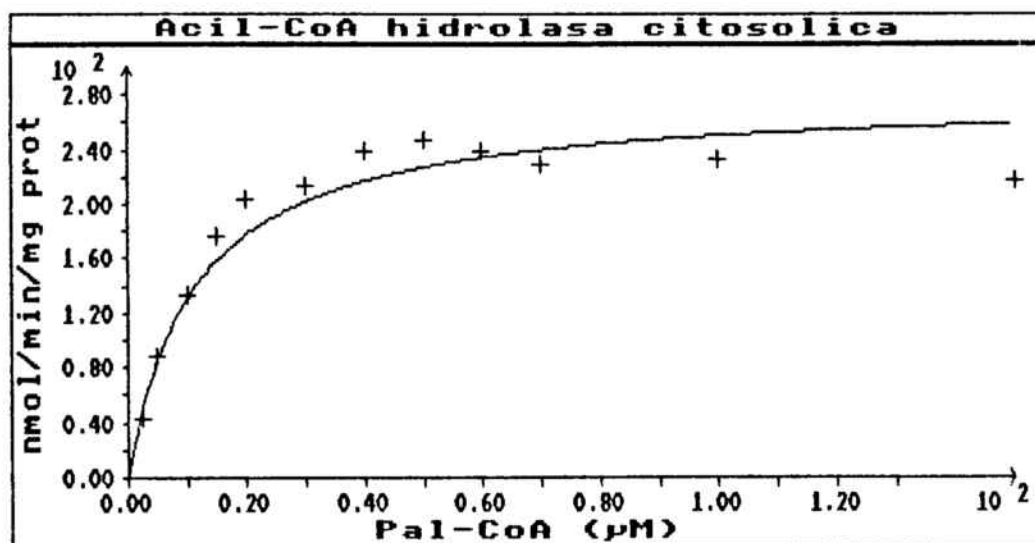


Figura III-5

Corba Pal-CoA sense BSA

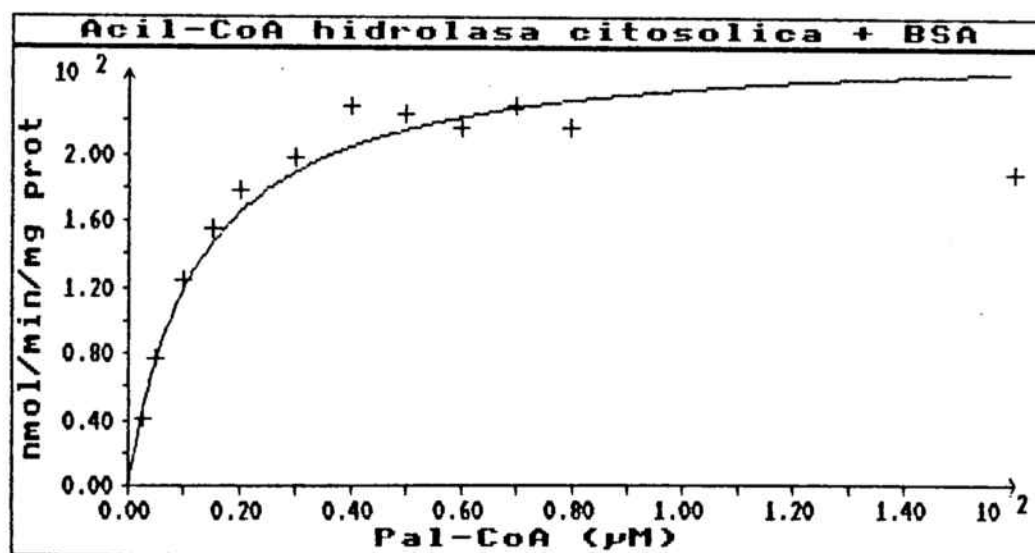


Figura III-6

Corba Pal-CoA amb BSA

De la comparació de les tables III-16 i III-18 es dedueix que l'activitat d'aquest enzim és lleugerament més alta quan no hi ha BSA en el medi, si bé el màxim en cada cas es troba al voltant de 40 - 50  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA.

En aquest cas, els resultats, tant en absència (figura III-5) com en presència de BSA (figura III-6) es van poder ajustar al model de Michaelis i Menten, de forma que es va passar a estudiar l'efecte exercit pels fàrmacs sobre aquest enzim.

## 2. Efecte dels fàrmacs

TAULA III-19. Efecte dels fàrmacs sobre l'acil-CoA hidrolasa citosòlica

|          | Activitat           |
|----------|---------------------|
| Control  | 293.6 (311.1-276.2) |
| CFB 1 mM | 291.2 (304.5-277.9) |
| CFB 5 mM | 281.2 (304.5-258.0) |
| BZF 1 mM | 286.2 (294.5-277.9) |
| BZF 5 mM | 306.0 (340.7-271.3) |
| GFB 1 mM | 295.9 (314.0-277.9) |
| GFB 5 mM | 318.3 (332.2-304.4) |

Resultats (mitja de les determinacions de dues preparacions citosòliques) expressats en nmol/min/mg de proteïna.

No s'observa cap efecte dels fàrmacs sobre l'activitat enzimàtica. Per descartar que això fos degut a la interferència de l'albumina, es va realitzar el mateix assaig sense addicionar BSA. Els resultats es mostren en la següent taula:

TAULA III-20. Efecte dels fàrmacs sobre l'acil-CoA hidrolasa citosòlica en absència de BSA

|          | Activitat           |
|----------|---------------------|
| Control  | 293.5 (310.8-276.2) |
| CFB 1 mM | 260.2 (321.9-198.5) |
| CFB 5 mM | 269.4 (313.9-225.0) |
| BZF 1 mM | 265.2 (305.5-225.0) |
| BZF 5 mM | 285.1 (338.7-231.6) |
| GFB 1 mM | 267.8 (313.9-221.7) |
| GFB 5 mM | 275.2 (305.6-244.8) |

Els resultats (nmol/min/mg prot.) corresponen a la mitja dels obtinguts a partir de dues preparacions diferents de citosol.

Donat que en cap cas es va poder determinar el tipus d'inhibició produïda per l'àcid clofíbric i els seus derivats sobre l'acil-CoA hidrolasa, i degut a la possibilitat de que això fos degut a la interacció entre el substrat lipòfil (acil-CoA) i l'entorn membranós de l'enzim, es va procedir a la solubilització de l'acil-CoA hidrolasa microsomal.

### SOLUBILITZACIO DE L'ACIL-CoA HIDROLASA MICROSOMAL

Per solubilitzar aquest enzim, segons el mètode descrit per Berge (1979), els microsomes, resuspesos en tampó HEPES 15mM, pH=7.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, DTT 0.1mM i EDTA 0.1mM, es mesclen amb un volum igual de n-butanol saturat d'aigua, mantenint-ho en agitació constant durant 2 minuts. La solució obtinguda es centrifuga a 40000 rpm durant 30 minuts. La fase aquosa es dialitza en front de 2 l del mateix tampó utilitzat per la resuspensió durant 24 hores a 4°C. Els resultats de l'experiment de purificació es mostren en la següent taula:

TAULA III-21. Solubilització de l'acil-CoA hidrolasa microsomal

|                      | Microsomes                      | Fracció aquosa                   |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Volum                | 4.4 ml                          | 5.2 ml                           |
| Total proteïna       | 90 mg                           | 7 mg                             |
| Activitat total      | 3194.3 ± 849.0<br>nmol/min      | 2157.1 ± 185.6<br>nmol/min       |
| Activitat específica | 35.9 ± 10.4<br>nmol/min/mg prot | 304.1 ± 16.6<br>nmol/min/mg prot |
| Recuperació          | 100%                            | 67.5%                            |

Amb l'enzim solubilitzat, es va realitzar un experiment comprovant que els percentatges d'inhibició produïts per clofibrat, bezafibrat i gemfibrozil són molt similars als obtinguts per l'enzim unit a membrana microsomal.

Finalment, es va estudiar la cinètica de la inhibició de l'acil-CoA hidrolasa microsomal solubilitzada pel gemfibrozil. Els resultats obtinguts es mostren en la següent taula:

TAULA III-22. Corba Palmitoil-CoA (enzim solubilitzat)

| Pal-CoA     | Control             | + GFB 0.25mM        | + GFB 0.5mM         |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 5 $\mu$ M   | 59.2<br>(55.1-63.4) | 34.4<br>(34.2-34.7) | 21.4<br>(18.7-24.2) |
| 10 $\mu$ M  | 129.1 $\pm$ 6.3     | 68.5 $\pm$ 5.8      | 40.2<br>(38.6-41.9) |
| 15 $\mu$ M  | 167.4 $\pm$ 11.0    | 80.7 $\pm$ 12.3     | 42.1<br>(36.4-47.9) |
| 20 $\mu$ M  | 201.4 $\pm$ 9.5     | 102.7 $\pm$ 12.9    | 62.8<br>(59.5-66.1) |
| 25 $\mu$ M  | 229.0 $\pm$ 2.9     | 111.3 $\pm$ 9.6     | 64.4<br>(62.8-66.1) |
| 30 $\mu$ M  | 263.1 $\pm$ 14.8    | 121.6 $\pm$ 15.3    | 65.5<br>(65.0-66.1) |
| 40 $\mu$ M  | 306.7 $\pm$ 16.0    | 132.1 $\pm$ 18.3    | 68.3<br>(68.3-68.3) |
| 60 $\mu$ M  | 333.3 $\pm$ 23.0    | 133.4 $\pm$ 20.1    | 65.8<br>(62.8-68.8) |
| 80 $\mu$ M  | 343.7 $\pm$ 26.7    | 129.1 $\pm$ 20.0    | 61.3<br>(61.1-61.5) |
| 100 $\mu$ M | 291.5 $\pm$ 18.1    | 98.4 $\pm$ 2.8      | 52.9<br>(52.9-53.0) |

Els resultats (nmols/min/mg prot.) corresponen a la mitja de valors de dues o tres preparacions microsomals  $\pm$  l'error standard.

Aquests resultats s'ajusten a l'equació de Michaelis i Menten, com s'observa en les Figures III-7-A, III-7 B i III-7-C. La Figura III-8 correspon a la representació de Lineweaver i Burk dels mateixos resultats. Els paràmetres cinètics obtinguts són:

TAULA III-23. Constants cinetiques aparents  
(acil CoA hidrolasa microsomal solubilitzada)

|              | Control | + GEM 0.25mM | + GEM 0.5mM |
|--------------|---------|--------------|-------------|
| $K_m$ ap     | 28.5    | 18.2         | 12.5        |
| $V_{max}$ ap | 470.0   | 180.6        | 83.7        |

S'observa que l'addició de concentracions creixents de gemfibrozil, produeix una disminució en la  $V_{max}$  i també, encara que no tan pronunciadament, en la  $K_m$ . Per tant, l'increment en el pendent causat per la disminució en la  $V_{max}$  queda compensat parcialment per la disminució del pendent deguda a l'increment en l'afinitat.

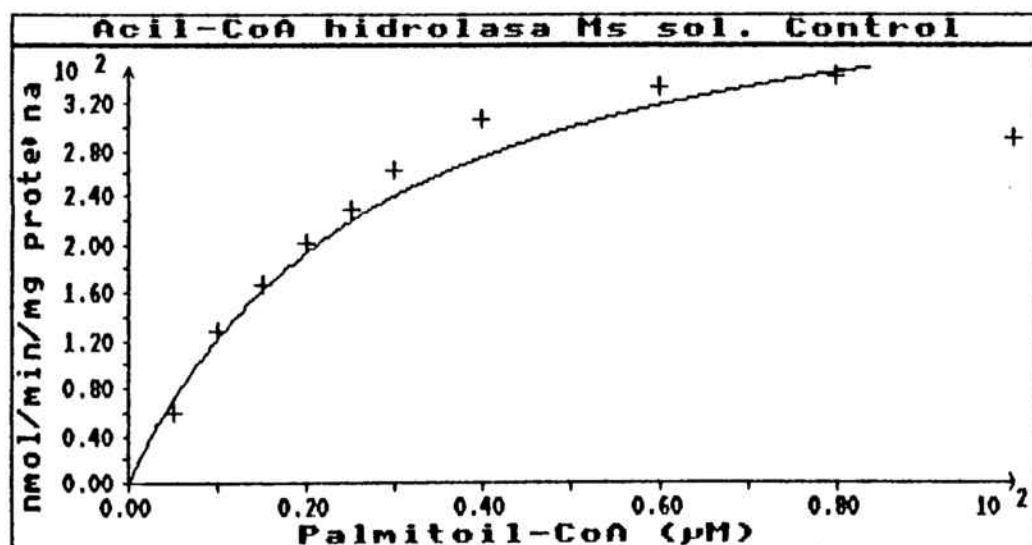


Figura III-7- A  
 Corba Pal-CoA control

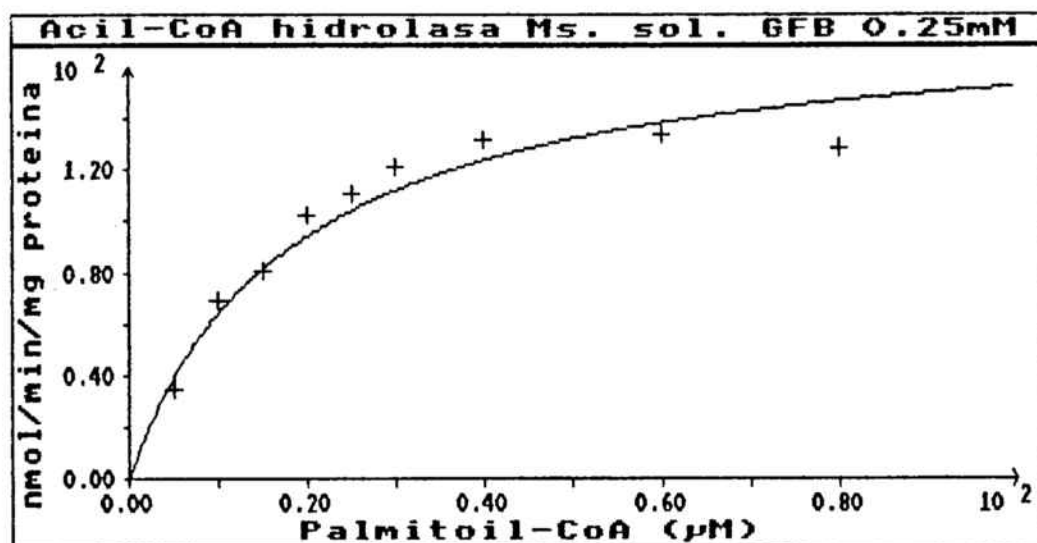


Figura III-7-B

Corba Pal-CoA amb GFB 0.25 mM

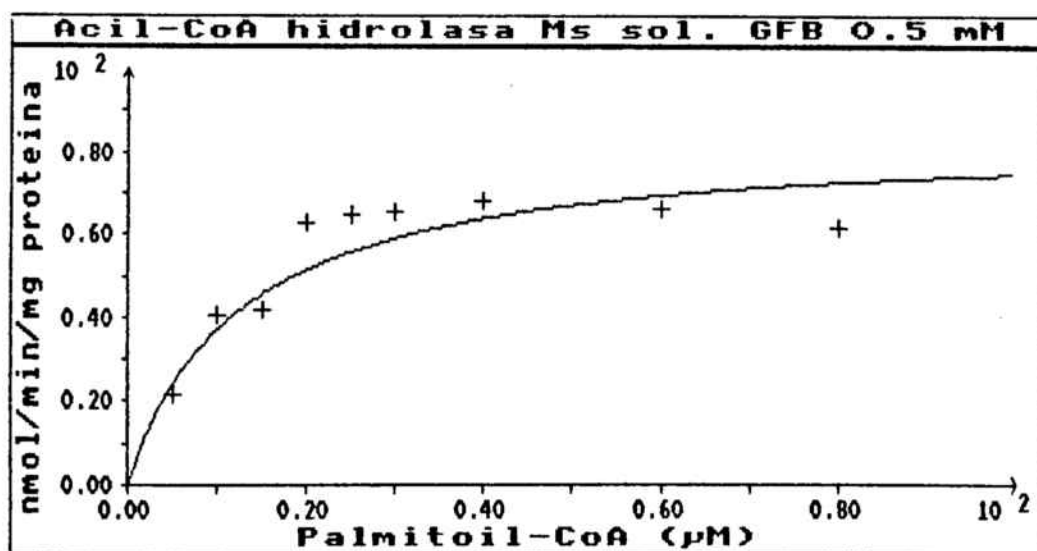


Figura III-7-C

Corba Pal-CoA amb GFB 0.5 mM

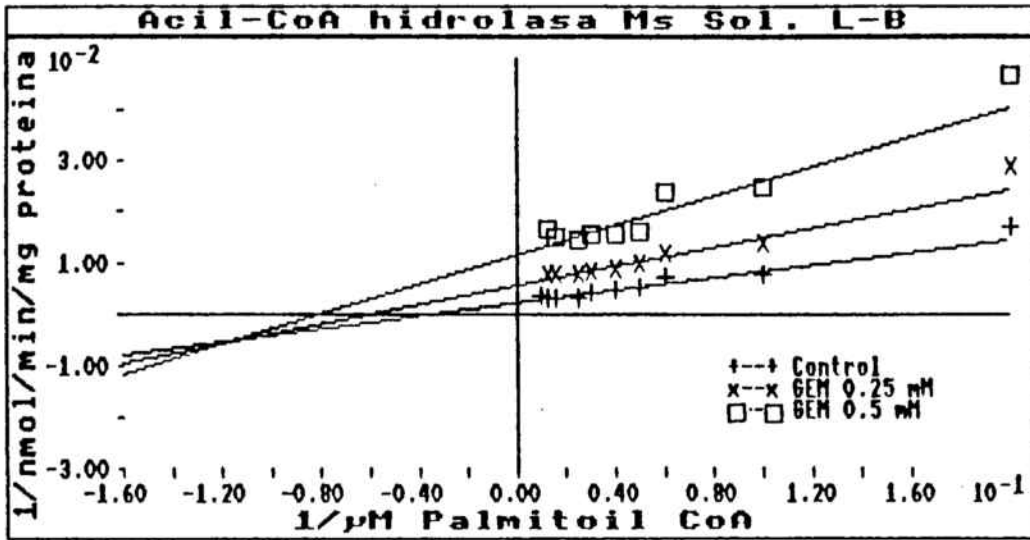


Figura III-8

Representació de Lineweaver i Burk



DISCUSSIO

Com ja s'ha esmentat a la part teòrica, existeixen nombrosos interrogants sobre els mecanismes pels quals els compostos anomenats genèricament "proliferadors peroxisòmics", entre els que s'inclouen la majoria de fàrmacs utilitzats en el tractament de les hiperlipoproteïnèmies, produeixen el seu efecte.

La present memòria està inclosa dins un projecte més ampli on es pretén clarificar els possibles mecanismes pels quals aquests fàrmacs exerceixen el seu efecte hipolipemiant a través de l'estudi dels seus efectes sobre diversos sistemes enzimàtics responsables de la síntesi hepàtica dels àcids grassos.

Les activitats enzimàtiques que es pretén avaluar vénen indicades a l'esquema (5).

En concret, en aquest treball, s'ha estudiat l'efecte "in vitro" de l'àcid clofibrí, bezafibrat i gemfibrozil sobre els següents sistemes enzimàtics:

- Enzims de localització citosòlica

- Enzim escissor del citrat
- Malat deshidrogenasa
- Enzim màlic
- Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa

Els tres primers, pertanyen al grup d'enzims que possibiliten la sortida de l'acetil-CoA (substrat de la sintasa citosòlica) de la mitocòndria al citosol. Com s'observa en les taules I-4, I-5, I-6 i I-7 només l'enzim màlic resulta lleugerament inhibit "in vitro" pels tres fàrmacs assajats. La magnitud d'aquesta inhibició a concentracions suprafisiològiques fa dubtar que aquest fenomen tingui transcendència "in vivo".

Per altra banda, l'enzim màlic i la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa són els enzims que proporcionen els equivalents reductors en forma de NADPH necessaris pel funcionament de l'àcid gras sintasa citosòlica. L'enzim màlic és important sobre tot en els adipòcits, però la principal font de NADPH en els hepatòcits és la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (Lehninger).

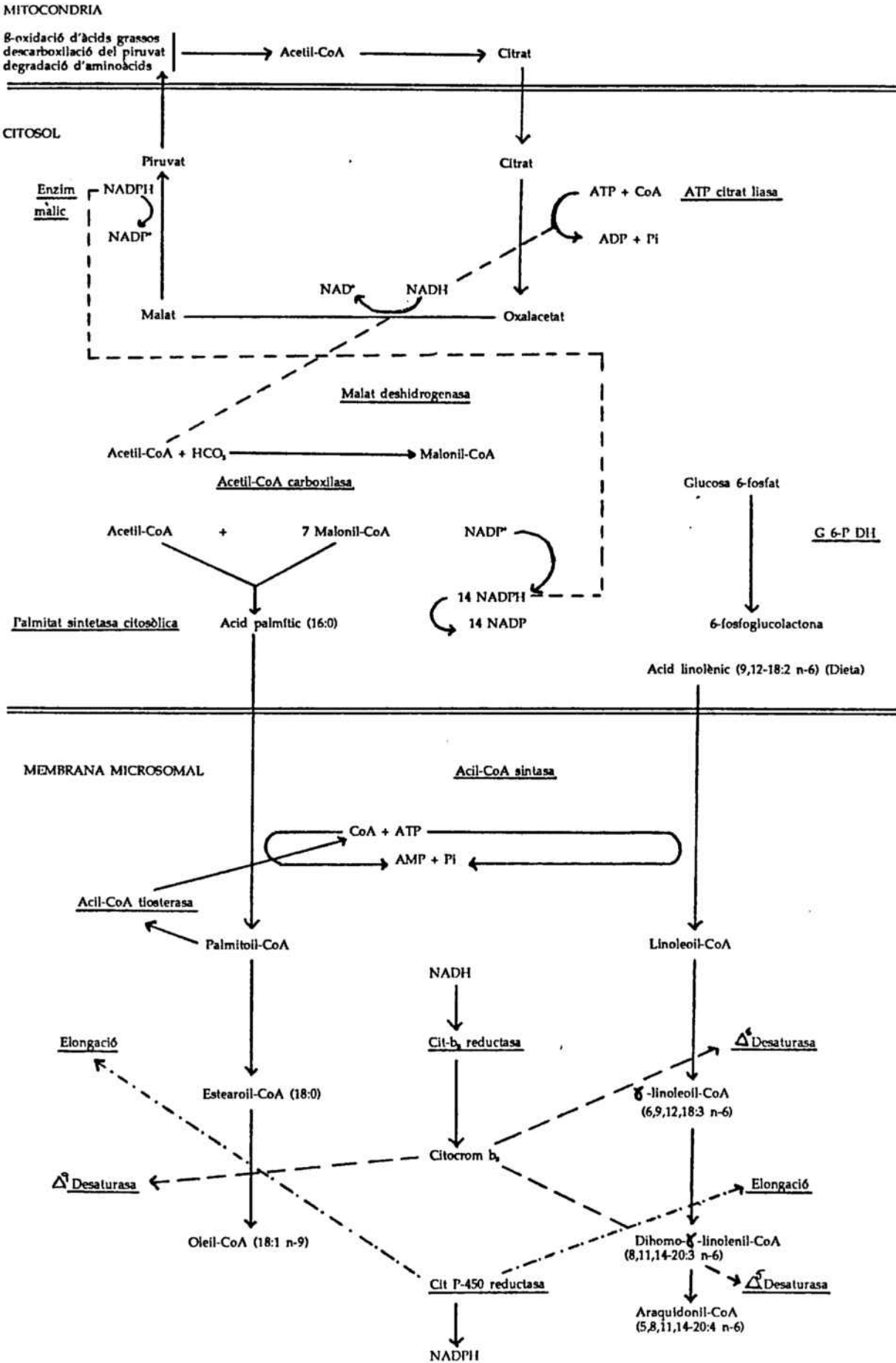
Aquest enzim resulta fortament inhibït "in vitro" per l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil, sent l'ordre de potència inhibitòria GFB > BZF > CFB.

Estudis "in vivo" realitzats únicament amb clofibrat, mostren profundes discrepàncies respecte l'efecte produït: en alguns estudis l'activitat de la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa s'ha vist incrementada, en altres disminuïda, i en altres no ha resultat afectada pel tractament semicrònic amb clofibrat ( Tosh i col., 1989 ). Per tant no es pot establir cap relació entre els efectes "in vivo" i "in vitro" d'aquests fàrmacs sobre la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

En un futur es preveu estudiar més a fons l'efecte "in vivo" i "in vitro" de tots tres fàrmacs sobre la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa per tal de realitzar estudis comparatius i determinar amb exactitud l'efecte produït.

#### - Enzims microsomals

- Cadenes de transport electrònic
  - . NADH-citocrom c reductasa
  - . NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa
  - . NADPH-citocrom c reductasa
  
- Acil-CoA hidrolasa



### Cadenes de transport electrònic microsomal

Les cadenes de transport electrònic microsomal ténen un importantíssim paper fisiològic, doncs vehiculitzen electrons des del NADH i el NADPH cap a nombroses reaccions metabòliques, algunes d'elles de gran rellevància en el procés de síntesi dels àcids grassos poliinsaturats en el fetge i altres teixits, per exemple elongació i desaturació ( Nagi i col., 1989 ).

En concret s'han avaluat les activitats **NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa** i **NADPH-citocrom P-450 reductasa** utilitzant com a acceptors artificials dels electrons el ferricianur potàssic i el citocrom c respectivament. Per altra banda s'ha determinat l'activitat conjunta del sistema NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa i del citocrom b<sub>5</sub>, activitat que globalment s'anomena **NADH-citocrom c reductasa**, utilitzant també com a acceptor artificial el citocrom c.

De les tres activitats esmentades, l'addició d'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil al medi d'incubació només afecta el sistema NADH-citocrom c reductasa ( Taules I-1, I-2 i I-3 ), resultant en un important increment en la seva activitat específica. Així, treballant a 100 µg de proteïna microsomal/ml, es produeixen increments en l'activitat enzimàtica del 21%, 29% i 95%, per l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil respectivament, tots ells a la concentració de 5 mM.

Cal destacar que l'ordre de potència estimuladora dels tres fàrmacs esmentats ( GFB > BZF > CFB ) es correspon amb l'ordre de potència terapèutica que manifesten aquests fàrmacs en el tractament de les hiperlipoproteïnèmies ( Todd i Ward, 1988 ).

L'efecte estimulador que produeixen aquests fàrmacs sobre el sistema NADH-citocrom c reductasa és degut a una interacció directa fàrmac-enzim, fet que es demostra quan a l'addicionar els fàrmacs en presència de NADH i citocrom c i en absència de proteïna microsomal, s'obté una activitat nul·la.

Altres característiques de l'efecte estimulador observat són la reversibilitat ( Taula II-5 ), i la independència del temps d'incubació ( Taula II-1 ) i de la quantitat de proteïna microsomal en l'interval de concentracions assajat (25-150 µg/ml) ( Taula II-2 ).

En canvi, s'observa una estricta dependència entre el grau d'estimulació produït i la concentració de fàrmac present ( Taula II-4 ).

Donat que en les nostres condicions de treball la màxima concentració de gemfibrozil que es pot assolir en el medi d'incubació és de 5 mM, és pràcticament impossible determinar experimentalment l'efecte màxim produït pel fàrmac. Per solventar aquest problema s'ha utilitzat l'anàlisi de Scatchard, segons el mètode aplicat per Kokarek i col. (1989), que ens permet deduir un valor d'estimulació màxima del 295% (assignant un 0% d'estimulació als valors control) i una  $CE_{50}$  de 9.5 mM pel gemfibrozil. A pesar de que aquest valor excedeix les concentracions màximes assolides en plasma després de l'administració terapèutica d'aquest fàrmac (0.06-0.1 mM) ( Todd i Ward, 1988 ), es dona la circumstància de que aquest fàrmac és l'únic dels tres assajats que té una marcada tendència a acumular-se en el fetge, de forma que no es pot descartar un possible efecte "in vivo".

En un estudi realitzat "in vivo" per Kawashima i col. (1989) s'ha trobat que l'administració d'àcid clofíbric al 0.5% p/p durant una setmana produeix una disminució en l'activitat NADH-citocrom c reductasa, sense que resulti afectada la NADH-citocrom  $b_5$  reductasa ni els nivells de citocrom  $b_5$ . Aquesta aparent contradicció entre els resultats "in vivo" i "in vitro" pot ser deguda al mètode (administració semicrònica o incubació durant uns minuts) o a la manifesta diferència de potència farmacològica entre clofibrat i gemfibrozil. En qualsevol cas, seria necessari efectuar tractaments "in vivo" amb els tres fàrmacs per tal de fer un estudi comparatiu dels efectes.

L'estudi cinètic de l'efecte estimulador del gemfibrozil sobre el sistema NADH-citocrom c reductasa es va realitzar en primer lloc mesurant l'activitat enzimàtica en presència de diferents concentracions de citocrom c ( Taula II-6 ). L'anàlisi dels resultats pel mètode de Lineweaver i Burk (figura II-2) ens proporciona els valors de les constants cinètiques aparents ( Taula II-7 ). Es pot observar que el valor de la  $v_{max}$  aparent s'incrementa molt ( 1515 nmol/min/mg pel control respecte 2299 nmol/min/mg en presència de GFB 3 mM ). Aquests resultats permeten deduir que el gemfibrozil facilita la transferència d'electrons del citocrom  $b_5$  reduït al citocrom c.

Quan es manté fixa la concentració de citocrom c i es varia la de NADH es produeix no només un increment en la  $v_{max}$  aparent ( 1245 nmol/min/mg pels valors control respecte 2043 nmol/min/mg en presència de GFB 3 mM ), sinó que concomitantment es produeix un augment en la  $k_m$  aparent, que passa de 5.6 en el control a 10.1 en presència de GFB 3 mM (Taula II-9). Aquests valors semblen indicar que el gemfibrozil produeix una disminució de l'afinitat del sistema pel NADH.

Donat que el gemfibrozil no afecta l'activitat NADH-citocrom  $b_5$  reductasa, és lògic pensar que el fàrmac no actua a nivell de la transferència d'electrons del NADH a la flavoreductasa. L'augment de la  $k_m$  aparent pel NADH indicaria, en canvi, que el gemfibrozil dificulta el pas dels electrons des de la reductasa al citocrom  $b_5$ . Aquesta dificultat es veu superada en presència de citocrom c degut a l'increment del flux d'electrons del citocrom  $b_5$  a l'acceptor artificial.

Per altra banda, es pot descartar que l'efecte sigui degut a una modificació directa del citocrom c, doncs l'activitat NADPH-citocrom c reductasa, on els electrons flueixen directament de la flavoproteïna a l'acceptor artificial, no es veu afectada per l'addició del fàrmac.

Es coneix amb força certesa que la transferència d'electrons entre el citocrom  $b_5$  i altres proteïnes, com el citocrom c i les dues flavoreductases microsomals, té lloc per acoblament de càrregues complementàries entre dominis positius d'aquestes proteïnes i la superfície aniònica del citocrom  $b_5$  ( Dailey i col., 1980; Tamura i col., 1988 ). Donat que l'àcid clofíbric i els seus derivats s'han utilitzat en la seva forma aniònica, és possible que els efectes observats siguin deguts a una interacció dels fàrmacs amb el citocrom  $b_5$  que d'alguna manera produís una reorganització de l'acoblament de càrregues.

Per altra banda, l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil ténen molta avidesa per unir-se a les proteïnes, de forma que les diferències de potencia que existeixen entre ells podrien adscriure's no solament a l'interacció de càrregues sinó també a les diferents afinitats d'unió amb el citocrom  $b_5$ .

### Acil-CoA hidrolasa

En el fetge de rata existeixen tres acil-CoA hidrolases diferents: una de localització microsomal, la segona localitzada en la matriu mitocondrial, i la tercera citosòlica ( Miyazawa i col., 1981 ).

Donat que, en principi, l'acil-CoA hidrolasa de més alta activitat és la microsomal ( Berge i col., 1981; Gatt i Bartfai, 1977 ), es va escollir aquest enzim per estudiar l'efecte de l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil sobre la seva activitat.

Com s'observa en la taula I-8, l'addició d'aquests fàrmacs provoca una marcada inhibició de la palmitoil-CoA hidrolasa microsomal. La inhibició produïda és depenent de la concentració de fàrmac addicionat al medi d'incubació, sent les  $Cl_{50}$  :

- 2.85 mM per l'àcid clofíbric

- 0.97 mM pel bezafibrat

- 0.15 mM pel gemfibrozil

Cal esmentar que la  $Cl_{50}$  pel gemfibrozil es troba dins els límits de concentració que s'assoleixen en el plasma humà després de l'administració de dosis terapèutiques d'aquest fàrmac ( Todd i Ward, 1988 ), de forma que sembla factible esperar un efecte "in vivo" del gemfibrozil sobre aquest enzim.

Per altra banda pot observar-se que la potència inhibidora d'aquests fàrmacs sobre l'acil-CoA hidrolasa microsomal és GFB > BZF > CFB, ordre que coincideix amb el corresponent a la seva efectivitat terapèutica.

Donat que el gemfibrozil és el més potent dels tres fàrmacs assajats, es va procedir a estudiar la inhibició produïda per aquest fàrmac, que es caracteritza per ser reversible ( Taula III-4 ), i independent del temps d'incubació ( Taula III-1 ) i de la quantitat de proteïna microsomal



present en el medi d'incubació, en l'interval de concentracions assajat (25-100 µg/ml) , com es mostra en la Taula III-2.

L'estudi de les característiques cinètiques de la inhibició de l'acil-CoA hidrolasa pel gemfibrozil va presentar moltes dificultats. En la Taula III-5, es mostren les activitats d'aquest enzim en absència i en presència de dues concentracions de gemfibrozil per a diferents concentracions de palmitoil-CoA. Aquests resultats s'han obtingut en presència d'una quantitat fixa (40 µM) de BSA en el medi d'incubació. Les dades obtingudes presenten un comportament lleugerament sigmoidal, de forma que no poden ajustar-se al model de Michaelis i Menten, resultant impossible el càlcul de les constants cinètiques i la determinació del tipus d'inhibició produït.

Aquestes desviacions del model de Michaelis i Menten són freqüents en enzims integrats o associats a membrana que utilitzen lípids amfipàtics com a substrat ( Gatt i col., 1977 a i b; Pauly i col., 1988; Bessoule i col., 1988 ). Aquests compostos poden trobar-se inclosos la membrana, disolts en el citosol en forma monomèrica o en forma micel·lar per sobre la concentració micel·lar crítica (CMC) ( Zahler i col., 1969 ). L'enzim pot utilitzar exclusivament una d'aquestes formes, dues d'elles o totes tres alhora, de forma que resulta molt difícil precisar la concentració real de substrat que utilitza l'enzim.

Per altra banda, en moltes situacions, com és el cas de l'acil-CoA hidrolasa, les formes micel·lars del substrat actuen com a inhibidors de l'activitat enzimàtica ( Berge i col., 1981 a ). A més, existeix l'aggravant de que la CMC, per sobre la qual comencen a formar-se les micel·les inhibidores, resulta difícil de determinar, doncs depèn del pH, força iònica i temperatura del medi on es troba disolt ( Berge i col., 1981 a ).

Una dificultat addicional la constitueix el fet que el palmitoil-CoA, així com altres acil-CoAs de cadena llarga, ténen propietats detergents, de forma que a concentracions molt altes poden alterar i fins i tot solubilitzar les membranes cel·lulars, afectant així els enzims integrants o associats a elles ( Zahler i col., 1969 ).

Per sota la CMC, l'acil-CoA hidrolasa microsomal purificada presenta comportament michaelià ( Berge i col., 1981 b ). Per això molts cops s'addiciona BSA al medi d'incubació, doncs aquesta, a l'unir-se a una gran proporció del palmitoil-CoA present, incrementa artificialment la CMC d'aquest, permetent treballar a concentracions altes de palmitoil-CoA sense que es formin micel·les

inhibitòries ( Gatt i col., 1977 ). L'addició de BSA s'ha de fer, però, a una relació òptima entre les concentracions de palmitoil-CoA i de BSA. Si es treballa per sota d'aquesta relació òptima, la BSA competeix efectivament amb l'enzim pel substrat present, dificultant així la reacció enzimàtica. Tampoc és convenient superar aquesta relació, doncs llavors la BSA està completament saturada i l'excés de palmitoil-CoA es tradueix en la formació de micel·les inhibidores.

Donat que els treballs de Berge i col. s'han realitzat amb enzim purificat i resulta difícil extrapolar els seus resultats a les nostres condicions de treball en les que s'han utilitzat preparacions microsomals, es va decidir determinar les condicions idònies per a la realització dels estudis cinètics en el nostre cas.

En primer lloc, es va determinar l'activitat enzimàtica en front de concentracions creixents de substrat en absència de BSA ( Taula III-6). Es va trobar que el màxim d'activitat es produïa a la concentració 40  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA. A concentracions més altes de substrat, l'activitat de l'enzim disminuïa, probablement degut a l'efecte inhibitori de les micel·les.

Donat que l'activitat màxima del'enzim depen de la relació de concentracions de palmitoil-CoA i BSA ( Berge, 1979 ) es va valorar quina era la relació òptima. Per fer-ho, es va determinar l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa en presència de BSA, utilitzant una concentració fixa (40  $\mu\text{M}$ ) de palmitoil-CoA. Els resultats (Taula III- 7) mostren que el màxim d'activitat s'obté entre 100 i 160 nmol Pal-CoA/mg BSA. Com a relació òptima es va escollir 120 nmol Pal-CoA/mg BSA, per ser aquesta la descrita a la bibliografia ( Berge, 1979; Berge i Farstad, 1981 ) i la que havíem utilitzat en els estudis inicials.

Per últim es va determinar l'activitat de l'enzim a diferents concentracions de substrat, mantenint per cadascuna d'elles la relació 120 nmol Pal-CoA/mg BSA ( Taula III-8 ). En aquestes condicions s'observa que el màxim d'activitat es produeix a una concentració més alta de palmitoil-CoA (60  $\mu\text{M}$ ), degut a que en presència de BSA , per una mateixa quantitat de substrat addicionat, la quantitat de monòmer lliure disponible per l'enzim és menor. Malauradament, inclús en aquestes condicions òptimes continua sent impossible l'ajust dels resultats al model de Michaelis i Menten.

Per altra banda, encara que en absència de BSA els percentatges d'inhibició produïts pels tres fàrmacs són pràcticament idèntics als obtinguts en presència de BSA ( comparar la Taula III-9 amb les taules III-3 A, B i C ), tampoc els resultats obtinguts en absència de BSA s'ajustaven al model michaelià.

Cal destacar que les condicions idònies per la valoració de l'acil-CoA hidrolasa microsomal i mitocondrial són les mateixes que les descrites en la bibliografia pels mateixos enzims purificats.

Degut a les dificultats que presentava l'estudi de les propietats cinètiques de l'acil-CoA hidrolasa microsomal, es va decidir estudiar l'efecte dels fàrmacs sobre l'enzim mitocondrial. Com en el cas anterior, l'addició d'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil al medi d'incubació té un efecte inhibitori sobre l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial, efecte que és dependent de la concentració de fàrmac addicionat. Les  $CI_{50}$  per cadascun d'ells són:

- 1.49 mM per l'àcid clofíbric
- 0.58 mM pel bezafibrat
- 0.13 mM pel gemfibrozil

De la comparació de les  $CI_{50}$  dels tres fàrmacs per les dues hidrolases estudiades es desprèn que l'enzim mitocondrial és més sensible a l'acció d'aquests fàrmacs, sobre tot a la de l'àcid clofíbric i del bezafibrat (  $CI_{50}$  per l'enzim microsomal de 2.85 mM i 0.97 respectivament).

En l'estudi de la cinètica de la inhibició de l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial es van obtenir resultats molt similars als obtinguts amb l'enzim microsomal: Concentració òptima de palmitoil-CoA en absència de BSA de 40  $\mu$ M ( Taula III-12 ), relació Pal-CoA/BSA de 120 nmol Pal-CoA/mg BSA ( Taula III-13 ) i concentració òptima de palmitoil-CoA en presència de BSA de 40-60  $\mu$ M ( Taula III-15 ).

La coincidència dels resultats és deguda a que a pesar de que són enzims diferents ( Berge i col., 1981 b ) el seu substrat comú (palmitoil-CoA) té un comportament molt semblant en un medi membranós similar. L'única diferència observada és que en aquest cas, l'addició de BSA produeix un descens en el percentatge d'inhibició ( comparar les taules III-15 amb les taules III-11 A,B i C).

De totes formes, les dades obtingudes tampoc van ajustar-se al model de Michaelis i Menten, ni tant sols a les condicions idònies trobades.

Donada la similitud dels resultats obtinguts amb les dues acil-CoA hidrolases de membrana, es va decidir estudiar l'efecte de l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil sobre una acil-CoA hidrolasa citosòlica. Per fer aquest estudi es va escollir l'acil-CoA hidrolasa de citosol de cervell, per les següents raons:

- en condicions normals, l'activitat de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica hepàtica és molt baixa, en tant que la de localització cerebral té una activitat molt elevada (5 o 10 vegades superior a la de l'enzim microsomal ).

- L'administració de proliferadors peroxisòmics en forma semi-crònica fa que s'indueixin en el citosol hepàtic dues formes de l'acil-CoA hidrolasa, anomenades hidrolases I i II ( Kawashima i col., 1982; Kawashima i col., 1983; Katoh i col., 1987 ). La forma I, que sembla ser la forma nativa, present en el fetge no induït, no es diferencia en quant a pes molecular, propietats cinètiques i estabilitat tèrmica de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica de cervell ( Katoh i col., 1987 ).

A l'igual que en els altres dos cassos, es va fer un estudi per determinar les condicions idònies per la valoració de l'activitat de l'enzim. En absència de BSA, la màxima activitat s'obté a 50  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA (Taula III-16). Per tal que els resultats fossin comparables, als obtinguts amb els anteriors enzims, i donat que la diferència entre les activitats obtingudes a 40 i a 50  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA és mínima ( 238 i 247 nmol/min/mg de proteïna respectivament), es va escollir 40  $\mu\text{M}$  com a concentració idònia.

De la Taula III-17 es desprèn que la relació òptima entre les concentracions de palmitoil-CoA i BSA oscil·la en un ampli marge entre 120 i 160 nmol Pal-CoA/mg BSA i per les mateixes raons abans exposades es va escollir com a idònia la relació de 120 nmol Pal-CoA/mg BSA. En aquest cas, però no té massa sentit parlar de relació òptima, doncs l'addició de BSA provoca una disminució en l'activitat de l'enzim (comparar Taules III-16 i III-18), probablement degut a depleció del substrat, resultats que concorden amb els obtinguts per Miyazawa i col. (1981) sobre la hidrolasa citosòlica hepàtica induïda per clofibrat.

El comportament cinètic de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica va ser completament diferent al dels enzims de membrana, doncs les dades, tant en absència com en presència de BSA, es van ajustar perfectament a l'equació de Michaelis i Menten.

Malauradament, però, en cap de les dues situacions es va detectar variació en l'activitat enzimàtica a l'addicionar els fàrmacs al medi d'incubació ( Taules III-19 i III-20 ). L'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil són, doncs, inefectius com a inhibidors de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica.

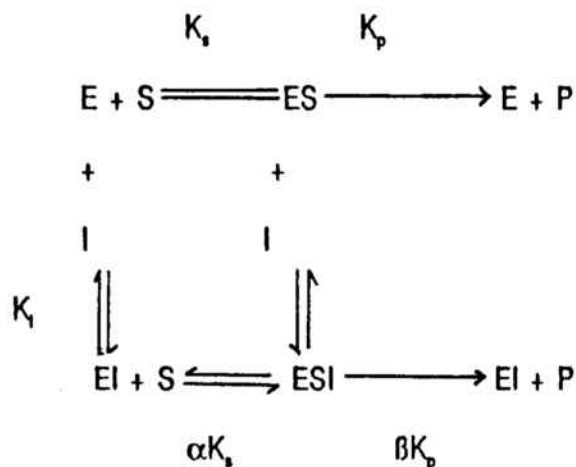
Es interessant destacar la correlació existent entre els resultats obtinguts "in vitro" i els presentats per certs autors després del tractament "in vivo" ( Berge i col., 1984; Mentlein, 1986), almenys en el cas del clofibrat, únic d'aquests fàrmacs amb el que s'han realitzat estudis exhaustius. Així, l'administració semicrònica de clofibrat en la dieta ( 0.3% p/p durant 10 dies ) produeix en els animals tractats una disminució en l'activitat acil-CoA hidrolasa microsomal i mitocondrial ( almenys en la fracció corresponent a les mitocòndries pesades ). En canvi l'acil-CoA hidrolasa citosòlica, que, com acabem de veure, és l'única que no resulta inhibida "in vitro", sofreix "in vivo" un increment enorme en la seva activitat, probablement per una resposta de compensació cel.lular ( Berge i col., 1981; Mentlein i col., 1986 ). Donat que l'àcid clofíbric és l'inhibidor menys potent dels tres fàrmacs assajats, seria interessant efectuar estudis "in vivo" similars als citats amb bezafibrat i gemfibrozil.

Tenint en compte que la cinètica de l'acil-CoA hidrolasa citosòlica s'ajusta al model de Michaelis i Menten, i les de les hidrolases de membrana no, es va pensar que la distorsió respecte el model michaelià podia ser deguda a la influència de l'entorn membranós. Per aquest motiu es va procedir a la solubilització de l'enzim microsomal segons el mètode de Berge (1979). Al tractar-se d'un enzim associat a membrana, no integrat en la mateixa, és fàcil solubilitzar-lo sense que es desnaturalitzi i perdi activitat.

Un cop solubilitzat, i havent comprovat que l'efecte inhibidor dels fàrmacs es mantenia en els mateixos percentatges, es va determinar l'activitat de l'enzim a concentracions creixents de palmitoil-CoA (relació 120 nmol Pal-CoA/mg BSA) en absència i en presència de dues concentracions diferents de gemfibrozil (0.25 i 0.5 mM).

En aquest cas els resultats ( Taula III-22 ) es van poder ajustar a l'equació de Michaelis i Menten. Sembla ser, doncs, que la desviació del comportament michaelià pot ser deguda a la interferència que suposa la interacció entre el substrat lipòfil i l'entorn lipídic de la membrana.

El sistema enzimàtic que estem considerant pot representar-se segons el següent esquema general (Segel):



E: enzim

P: producte

I: inhibidor

$$K_s = \frac{E S}{ES} \quad (\text{Constant de dissociació del complex ES})$$

$$K_i = \frac{E I}{EI} \quad (\text{Constant de dissociació del complex EI})$$

$K_p$  = Constant de velocitat de formació de producte



L'anàlisi de Lineweaver i Burk de les dades obtingudes amb l'acil-CoA hidrolasa solubilitzada mostra rectes que es creuen en un punt per sota l'eix d'abscisses (Figura III-8).

Al calcular les constants cinètiques, es va trobar que l'addició de gemfibrozil al medi d'incubació provocava la disminució tant de la  $K_m$  com de la  $V_{max}$  aparents. Es tracta, doncs, d'una inhibició de tipus mixte.

La disminució de la  $K_m$  vol dir que l'afinitat del complex EI pel substrat és major que la de l'enzim E ( $\alpha < 1$ ).

Per altra banda, la disminució de la  $V_{max}$  aparent pot ser deguda a dues situacions:

- a que la productivitat del complex EIS sigui menor que la del complex ES ( $\beta < 1$ ).
- a que el complex ESI no sigui productiu ( $\beta = 0$ )

En el primer cas, es tractaria d'una inhibició hiperbòlica mixta ( $\alpha < 1$ ,  $\beta < 1$ ). Donat que el complex ESI pot formar producte, la velocitat de la reacció si ens trobéssim en aquest sistema mai podria fer-se zero, per molt que s'incrementés la concentració d'inhibidor.

En canvi en el segon cas (inhibició mixta lineal), la presència d'una concentració suficientment elevada d'inhibidor, pot conduir a l'anul.lació total de l'activitat enzimàtica.

El fet que els resultats mostrats en la taula I-8 indiquen que el gemfibrozil, a una concentració de 5 mM i en presència de la mateixa quantitat de proteïna utilitzada en la valoració de les característiques cinètiques, produeix una inhibició pràcticament total (99.3%) fa pensar que ens trobem davant d'una inhibició de tipus **no competitiu, mixte i lineal**.

Per últim, destacar que sempre que hem trobat un efecte farmacològic, l'ordre de potència pels tres fàrmacs estudiats és el mateix ( GFB > BZF > CFB ), idèntic a l'ordre de potència terapèutica en la seva utilització en clínica humana. Encara que és massa aviat per treure conclusions i falten encara moltes activitats enzimàtiques per estudiar, així com la realització de l'estudi comparatiu de les activitats "in vivo" dels tres fàrmacs, aquesta coincidència sembla indicar que ens trobem en un camí adequat.

## CONCLUSIONS



### A. Cadenes de transport electrònic microsomal

1. De les tres activitats enzimàtiques estudiades ( **NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa**, **NADPH-citocrom c reductasa** i **NADH-citocrom c reductasa**), només aquesta darrera resulta afectada per l'addició de l'àcid clofibrí i els seus derivats bezafibrat i gemfibrozil al medi d'incubació, produint-se una estimulació de l'activitat enzimàtica. L'ordre de potència per a aquest efecte és GFB > BZF > CFB.

2. L'estimulació de l'activitat NADH-citocrom c reductasa no depèn ni del **temps d'incubació** ni de la **concentració de proteïna microsomal** present en el medi d'incubació en l'escala de concentracions assajada (25-150 µg/ml), és **reversible** i mostra una estricta dependència de la **concentració de fàrmac** present.

En les nostres condicions de treball, el gemfibrozil produeix una estimulació màxima del 295%, sent la seva CE<sub>50</sub> de 9.5 mM.

3. El fet que l'activitat NADH-citocrom b<sub>5</sub> reductasa no resulta modificada indicaria que el pas dels electrons de la flavoreductasa al citocrom c no es veu afectat pel fàrmac. Per altra banda, l'estimulació tampoc sembla ser deguda a una modificació directa del citocrom c, doncs l'activitat NADPH-citocrom c reductasa no es veu afectada per l'addició d'aquests fàrmacs al medi d'incubació.

Per tant, possiblement l'únic punt on aquests poden actuar és modificant el flux d'electrons a través del **citocrom b<sub>5</sub>** .

4. L'addició de concentracions creixents de gemfibrozil provoca un increment en la  $v_{max}$  i en la  $k_m$  aparents pel **NADH**. En canvi, pel **citocrom c** només s'incrementa la  $v_{max}$  aparent, en tant que la  $k_m$  no varia. Hipotèticament, això pot significar que el fàrmac dificulta el pas dels electrons des de la reductasa fins al citocrom  $b_5$ , i al mateix temps incrementa el flux electrònic des d'aquest fins l'acceptor artificial, el citocrom **c**. En el sistema en conjunt predominaria aquest efecte, manifestant-se el fenomen d'estimulació.

### B. Acil-CoA hidrolasa

1. S'ha pogut demostrar que les condicions òptimes de valoració de les hidrolases microsomal i mitocondrial (40  $\mu$ M de palmitoil-CoA, 120 nmol Pal-CoA/mg BSA) són idèntiques a les establertes per les formes purificades d'aquests enzims.

2. L'activitat acil-CoA hidrolasa resulta **inhibida** per l'addició d'àcid clofibrí, bezafibrat i gemfibrozil al medi d'incubació. Aquests fàrmacs mostren una selectivitat d'acció en front les diferents hidrolases estudiades, en l'ordre **acil-CoA hidrolasa mitocondrial > microsomal > citosòlica**. Aquest darrer enzim pràcticament no resulta afectat.

3. La inhibició de l'acil-CoA hidrolasa microsomal pel gemfibrozil és **reversible**, no depèn del **temps d'incubació** ni de la **quantitat de proteïna microsomal** present (25-150  $\mu$ g/ml), i manifesta una relació estricta entre la **concentració de fàrmac** i el grau d'inhibició assolit. Les  $CI_{50}$  pels tres fàrmacs estudiats són:

- 2.85 mM per l'àcid clofibrí
- 0.97 mM pel bezafibrat
- 0.15 mM pel gemfibrozil

L'ordre de potència inhibidora és **GFB > BZF > CFB**.

4. L'ordre de potència inhibidora per l'acil-CoA hidrolasa mitocondrial és el mateix que per l'enzim microsomal, presentant les següents  $CI_{50}$  :

- 1.49 mM per l'àcid clofíbric
- 0.58 mM pel bezafibrat
- 0.13 mM pel gemfibrozil

5. Cal destacar que la  $CI_{50}$  del gemfibrozil per les acil-CoA hidrolases microsomal i mitocondrial es troba dins els valors de concentració màxima plasmàtica assolida per aquest fàrmac en la seva administració en clínica humana.

6. La solubilització de l'acil-CoA hidrolasa microsomal permet evidenciar que l'efecte inhibidor és degut a una interacció directa **fàrmac-enzim**, no a un efecte inespecífic sobre la membrana, doncs l'inhibició persisteix inclús després d'alliberar l'enzim del seu entorn membranós.

7. L'ajust a la cinètica michaeliana que s'aconsegueix al solubilitzar l'enzim, permet determinar els valors de les constants cinètiques aparents  $v_{max}$  i  $k_m$ , les quals disminueixen en presència de gemfibrozil. Els resultats obtinguts permeten suposar que la inhibició és de tipus **no competitiu, lineal i mixte**.

### C. Enzims citosòlics

S'ha estudiat l'efecte de l'àcid clofíbric, bezafibrat i gemfibrozil sobre les següents activitats enzimàtiques:

- Enzim escissor del citrat
- Màlic deshidrogenasa
- Enzim màlic
- Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa

Els fàrmacs assajats provoquen una inhibició de les activitats de l'enzim **màlic i** , amb una major intensitat, de la **glucosa 6-fosfat deshidrogenasa**, sent l'ordre de potència inhibidora **GFB > BZF > CFB**.

Finalment, destacar el fet que per tots els efectes descrits l'ordre de potència farmacològica ( **GFB > BZF > CFB** ) és idèntic a l'**ordre d'efectivitat clínica** en la seva aplicació terapèutica.

BIBLIOGRAFIA

Abshagen U., Bablok W., Koch K., Lang P.D., Schmidt H.A.E. et al.  
Disposition pharmacokinetics of bezafibrate in man.  
*Eur. J. Clin. Phar.* 16, 31-38 (1979)

Abshagen U., Spörl-Radun S., Marinow J.  
Steady-state kinetics of bezafibrate and clofibrate in healthy female volunteers.  
*Eur. J. Clin. Phar.* 17, 305-308 (1980)

Agustin J., Gnasso A.  
Effect of gemfibrozil on lipids, apoproteins and post-heparin lipolytic activities in normolipidemic subjects.  
In: Today's therapeutic trends pp 23-29. Bickers et al. eds. Communications Media for Education Inc., Princeton Junction. New Jersey (1985)

Anònim  
Lopid (Gemfibrozil): Compendium of pharmacological and clinical studies.  
Warner Lambert Company (1982)

Awasthi Y.C., Singh S.V., Goel S.K., Reddy J.K.  
Irreversible inhibition of hepatic glutathione-S-transferase by ciprofibrate, a peroxisome proliferator.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 1012-1018 (1984)

Bains S.K., Gardiner S.M., Mannweiler K., Gillett D., Gibson G.G.  
Immunochemical study on the contribution of hypolipidaemic-induced cytochrome P-452 to the metabolism of lauric acid and arachidonic acid.  
*Biochem. Pharmacol.* 34, 3221-3229 (1985)

Barnard S.D., Molello J.A., Caldwell W.J., LeBeau J.E.  
Comparative ultrastructural study of rat hepatocytes after treatment with the hypolipidemic agents probucol, clofibrate and fenofibrate.  
*J. Toxicol. Environ. Health* 6, 547 (1980)

Barret A.M.  
Mode of action of clofibrate in relation to plasma free fatty acids.  
*Int. J. Clin. Pharmac.* 1, 29-32 (1969)

Beckett R.B., Weiss R., Stitzel R.E., Cenedella R.J.  
Studies on the hepatomegaly caused by the hypolipidemic drugs nafenopin and clofibrate.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 42-53 (1972)

Berge R.K.  
Purification and characterization of a long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver microsomes.  
*Biochim. Biophys. Acta* 574, 321-323 (1979)

Berge R.K.  
Physicochemical properties of the long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver microsomes.  
*Eur. J. Biochem.* 111, 67-72 (1980)

Berge R.K., Aarsland A.  
Correlation between the cellular level of long-chain acyl-CoA, peroxisomal beta-oxidation and palmitoyl-CoA hydrolase activity in rat liver. Are the two enzyme systems regulated by a substrate-induced mechanism?  
*Biochim. Biophys. Acta*, 837, 141-151 (1985)

Berge R.K., Bakke O.M.

Changes in lipid metabolizing enzymes of hepatic subcellular fractions from rats treated with tiadenol and clofibrate.

Biochem. Phar. 30, 16, 2251-2256 (1981)

Berge R.K., Farstad M.

Long-chain fatty acyl-CoA hydrolase from rat liver mitochondria.

In: Methods in enzymology Vol. 71, pp 234-242. Colowick S.P., Kaplan N.O. eds. Acad. Press N.Y.

Berge R.K., Flatmark T., Osmundsen H.

Enhancement of long chain acyl-CoA hydrolase activity in peroxisomes and mitochondria of rat liver by peroxisome proliferators.

Eur. J. Biochem. 141, 637-644 (1984)

Berge R.K., Slinde E., Farstad M.

Variations in the activity of microsomal palmitoyl-CoA hydrolase in mixed micelle solutions of palmitoyl-CoA and non ionic detergents of the Triton X series.

Biochim. Biophys. Acta 666, 25-35 (1981)

Berge R.K., Stensland E., Aarsland A., Tsegai G., Osmundsen H.

Aarsaether N., Gjellesvik D.G.

Induction of cytosolic clofibroyl-CoA hydrolase activity in liver of rats treated with clofibrate.

Biochim. Biophys. Acta 918, 60-66 (1987)

Berndt J., Gaumert R., Still J.

Mode of action of the lipid-lowering agents clofibrate and BM 15075 on cholesterol biosynthesis in rat liver.

Atherosclerosis 30, 147-152 (1978)

Bessoule J-J., Lessire R., Cassagne C.

Theoretical analysis of the activity of membrane-bound enzymes using amphiphilic or hydrofobic substrates. Application to the acyl-CoA elongases from *Allium porrum* cells.

Biochim. Biophys. Acta 983, 35-41 (1989)

Brady P.S., Brady L.J.

Effects of clofibrate and AAS on hepatic CPT synthesis.

Biochem. Phar. 38, 5, 811-814 (1989)

Brady P.S., Marine K.A., Brady L.J., Ramsay R.R.

Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs.

Biochem. J. 260, 93-100 (1989)

Bridges B.A.

An approach to the assessment of risk to man from DNA damaging agents.

Arch. Toxicol., Suppl.3, 271-281 (1980)

Caldwell J., Emudianuglie T.S.

The structure of the glucuronic conjugate of clofibric acid.

Biochem. Soc. Trans. 7, 521-522 (1979)

Carlson L.A., Olsson A.G.

Effect of hypolipidemic drugs on serum lipoproteins.  
Prog. Biochem. Pharmacol. 15, 238-257 (1979)

Cayen M.N.

Disposition, metabolism and pharmacokinetics of antihyperlipidemic agents in laboratory animals and man.  
Pharmac. Ther. 29, 157-204 (1985)

Cayen M.N., Ferdinandi E.S., Greselin E., Robinson W.T., Dvornik D.

Clofibrate and clofibric acid: comparison of the metabolic disposition in rats and dogs.  
J. Pharmac. Exp. Ther. 200, 33-43 (1977)

Cayen M.N., Kraml M., Ferdinandi E.S., Greselin E., Dvornik D.

The metabolic disposition of etodolac in rats, dogs and man.  
Drug Metab. Rev. 12, 339-362 (1981)

Cohen A.J., Grasso P.

Review of hepatic response to hypolipidemic drugs in rodents and assesment of its toxicological significance to man.  
Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 585 (1981)

Constantinides P.P., Steim J.M.

Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape.  
J. Biol. Chem. 260, 12, 7573-7580 (1985)

Cook H.W.

Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes.  
In Biochemistry of lipids and membranes. Chapter 6, pp 181-212. Vance D.E, Vance J.E. eds. The Benjamin / Cummings Publishing Co. Inc. California.

Chasseaud L.F., Cooper A.J., Siggers V.H.

Plasma concentration and bioavailability of clofibrate after administration to human subjects.  
J. Clin. Pharmac. 27, 2063-2065 (1974)

Christiansen R.Z.

The effect of clofibrate feeding on hepatic fatty acid metabolism.  
Biochim. Biophys. Acta 530, 314-324 (1978)

Christiansen R.Z., Osdmundsen H., Borrebaek B., Bremer J.

The effects of clofibrate feeding on the metabolism of palmitate and erucate in isolated hepatocytes.  
Lipids , 487-491 (1978)

Dailey H.A., Strittmatter P.

Characterization of the interaction of amphypatic cytochrome b5 withstearyl-Coenzyme A desaturase and NADPH:cytochrome P-450 reductase.  
J. Biol. Chem. 255, 5184-5189 (1980)

Dalton C., Hope W.C., Hope H.R., Sheppard H.

Relationship of serum triglyceride lowering to changes in hepatic composition induced by different classes of drugs.  
Biochem. Pharmacol. 23.685-696 (1974)



Das A.K., Aquilina J.W., Hajra A.K.

The rapid induction of liver glycerophosphate acyltransferase in mice by clofibrate, a hypolipidemic agent.

J. Biol. Chem. 258, 5, 3090-3093 (1983)

De Duve C., Baudhuin P.

Peroxisomes (microbodies and related particles).

Physiol. Rev. 46, 323-357 (1966)

De la Iglesia F.A., Lewis J.E., Buchanan R.A., Marcus E.L., MacMahon G.

Light and electron microscopy of liver in hyperlipoproteinemic patients under long-term gemfibrozil treatment.

Atherosclerosis 43, 19-37 (1982)

Dommes V., Baumgart C., Kunan W.H.

Degradation of unsaturated fatty acids in peroxisomes: Existence of a 2-4-dienoyl-CoA reductase pathway.

J. Biol. Chem. 256, 8259-8262 (1981)

Dror Y., Sassoon H.F., Watson J.J., Johnson B.C.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay in liver and blood.

Clin. Chim. Acta 28, 291-298 (1970)

Dujovne C.A., Harris W.S.

The pharmacological treatment of dyslipidemia.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 265-288 (1989)

Dvornik D., Cayen M.N.

Drugs affecting lipoprotein disposition in laboratory animals.

In: Drugs affecting lipid metabolism pp 263-272. Fumagalli et al eds. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980)

Eacho P.I., Foxworthy P.S.

Inhibition of hepatic fatty acid oxidation by bezafibrate and bezafibroyl-CoA.

Biochim. Biophys. Res. Comm. 157, 3, 1148-1153 (1988)

Facino R.M., Carini M.

Effect of the hypolipidaemic drug bezafibrate on the hepatic MFO system of the rat: Heterogeneity in mono-oxygenase responses.

Pharmacol. Res. Commun., 861-871 (1981)

Fahimi D.H., Reinicke A., Sujatta M., Yokota S., Ozel M.

The short and long term effects of bezafibrate in the rat.

Ann. NY Acad. Sci. 383, 111-135 (1982)

Fitzgerald J.E., Sanyer J.L., Schardein J.L., Lake R.S., MacGuire E.J., de la Iglesia F.A.

Carcinogen bioassay and mutagenicity studies with the hypolipidemic agent gemfibrozil.

J. Natl. Cancer Inst. 67, 1105-1116 (1981)

Frederickson D.S., Lee R.S.

A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.

Circulation 31, 321-327 (1965)

Gatt S., Bartfai T.

Rate equations and simulation curves for enzyme reactions which utilize lipids as substrates. I. Interaction of the enzymes with the monomers and micelles of soluble amphiphilic lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 1-12 (1977)

Gatt S., Bartfai T.

Rate equations and simulation curves for enzymatic reactions which utilize lipids as substrates. II. Effect of adsorption of the substrate or enzyme on the steady-state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 13-24 (1977)

Gavish D., Oschry Y., Fainaru M., Eisenberg S.

Change in very low-, low- and high-density lipoproteins during lipid lowering bezafibrate therapy: studies on type IIa and type IIb hyperlipoproteinemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 16, 61-68 (1986)

Goldstein J.L., Brown M.S.

Familial hypercholesterolemia.

In: *The metabolic basis of inherited diseases*. Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Frederickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. eds. Mac Graw-Hill Book Co. N.Y. p. 672 (1983)

Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.M.

HDL as a protective factor against coronary heart disease. The Farmington study. *American J. Med.* 12, 707-714 (1977)

Gotto A.M., Bierman E.L., Connor W.E.

Recommendations for treatment of hyperlipidemia in adults. *Circulation* 69, 1065-1090, (1984)

Gugler R., Hartlapp J.

Clofibrate kinetics after single and multiple doses. *Clin. Pharmac. Ther.* 24, 432-438 (1978)

Hanefeld M., Kemmer C., Leonhardt W., Kunze K.D., Jaross W., Haller H.

Effects of p-chlorophenoxyisobutyric acid (Cp 113) on the human liver. *Atherosclerosis* 36, 159-172 (1980)

Hardie D.G.

Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog. Lip. Res.* 28, 117-146 (1989)

Hartig R., Stegmeier K., Hebold G., Ozel M., Fahimi H.D.

Study of liver enzymes: Peroxisome proliferation and tumour rates in rats at the end of carcinogenicity studies with bezafibrate and clofibrate. *Ann. NY Acad. Sci.* 386, 464-467 (1982)

Hawkins J.M., Jones W.E., Bonner F.W., Gibson G.G.

The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug Metabol. Rev.* 18 (4), 441-515 (1987)

Hayashi H., Hino S., Yamasaki F.

Intraparticulate localization of some peroxisomal enzymes related to fatty acid beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.* 120, 47-51 (1981)

Hess R., Stäubli W., Riess W.

Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy- isobutyrate in the rat.  
*Nature* 208, 856-858 (1965)

Horie S., Suzuki T., Suga T.

Existence of acetyl-CoA dependent chain elongation system in hepatic peroxisomes of rat: effects of clofibrate and DEHP on the activity.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 274, 1, 64-73 (1989)

Houin G., Thébault J.J., D'Athis P., Tillement J-P., Beaumont J-L.

A GLC method for estimation of chlorophenoxyisobutyric acid in plasma. Pharmacokinetics of a single oral dose of clofibrate in man.  
*Eur. J. Clin. Pharmac.* 8, 433-437 (1975)

Hudson K., Day A.J.

The effect of bezafibrate and clofibrate on microsomal ACAT and lysosomal cholesterol ester hydrolase activity in the cholesterol-fed rabbit aorta.  
*Atherosclerosis* 45, 109-113 (1982)

Ilan Z., Ilan R., Cinti D.L.

Evidence for a new physiological role of hepatic NADPH-ferricytochrome (P-450) oxidoreductase. Direct electron input to the fatty acid elongation system.  
*J. Biol. Chem.* 256, 19, 10066-10072 (1981)

Illingworth D.R.

Lipid-lowering drugs. An overview of indications and optimum therapeutic use.  
*Drugs* 33,259-279 (1987)

Jeffcoat R.

The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver  
*Essays in Biochem.* 15, 1-36, (1979)

Katoh H., Kawashima Y., Watanuki H., Kozuka H., Isono H.

Effects of clofibric acid and tiadenol on cytosolic long chain acyl-CoA hydrolase and peroxisomal beta oxidation in liver and extrahepatic tissues of rats.  
*Biochim. Biophys. Acta* 920, 171-179 (1987)

Kawashima Y., Hanioka N., Matsumura M., Kozuka H.

Induction of microsomal stearyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators.  
*Biochim. Biophys. Acta* 752, 259-264 (1983)

Kawashima Y., Hirose A. Kozuka H.

Modification by clofibric acid of acyl composition of glycerolipids in rat liver. Possible involvement of fatty acid chain elongation and desaturation.  
*Biochim. Biophys. Acta* 795, 543-551 (1984b)

Kawashima Y., Hirose A., Kozuka H.

Selective increase in acylation of 1-acylglycerophosphorilcholine in livers of rats and mice by peroxisome proliferators.  
*Biochim. Biophys. Acta* 793, 232-237 (1984a)

Kawashima Y., Katoh H., Kozuka H.

Sex-related difference in the effect of clofibric acid on induction of two novel long-chain acyl-CoA hydrolases in rat liver.

Biochim. Biophys. Acta 712, 48-56 (1982)

Kawashima Y., Katoh H., Kozuka H.

Differential effects of altered hormonal state on the induction of acyl-CoA hydrolases and peroxisomal beta-oxidation by clofibric acid.

Biochim. Biophys. Acta 750, 365-372 (1983)

Kesäniemi Y.A., Grundy S.M.

Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man.

JAMA 251, 2241-2246 (1984)

Keyes S.R., Alfano J.A., Jansson I., Cinti D.L.

Rat liver microsomal elongation of fatty acids. Possible involvement of cytochrome b5.

J. Biol. Chem. 254, 16, 7778-7784 (1979)

Klose G., Behrendt J., Greten H.

Effect of bezafibrate on the activity of LPL and hepatic triglyceride hydrolase in healthy volunteers.

In: Lipoproteins and coronary heart disease. Greten H., Lang P.D., Schettler G. eds. Witzstock Publishing House, N.Y. p. 182 (1980)

Kocarek T.A., Feller D.R.

Quantitative assessment of enzyme induction by peroxisome proliferators and application to determination of effects on triglyceride biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes.

Biochem. Phar. 38, 23, 4169-4176 (1989)

Kraupp B., Huber W., Schulte Hermann R.

Liver growth and early cellular changes in response to peroxisome proliferation.

Biochem. Soc. Trans. 18, 1990-1992 (1989)

Krause B.R., Newton R.S.

Apolipoprotein changes associated with the plasma lipid-regulating activity of gemfibrozil in cholesterol-fed rats.

J. Lip. Res. 26, 940-949 (1985)

Krisans S.K., Mortensen R.M., Lazarow P.B.

Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes: computer analysis of cell fractionation experiments.

J. Biol. Chem. 255, 9599-9607 (1980)

Kudchodker B.J., Sodhi H.S., Horlick L.

Effects of clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man.

JAMA 251, 2241-2246 (1984)

Kurup C.K.R., Aithal H.M., Ramasarma T.

Increase in hepatic mitochondria on administration of ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate to the rat.

Biochem. J. 116, 773-779 (1970)

Lalwani N.D., Fahl W.E., Reddy J.K.

Detection of a nafenopin-binding protein in rat liver cytosol associated with the induction of peroxisome proliferation by hypolipidemic compounds.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 116, 388-393 (1983)

Lalwani N.D., Reddy M.K., Mangkornkanok-Mark M., Reddy J.K.  
 Induction, immunochemical identity and immunofluorescence localization of an 80000 molecular-weight peroxisome proliferation-associated polypeptide (polypeptide PPA-80) and peroxisomal enoyl-CoA hydratase of mouse liver and renal cortex. *Biochem J.* 198, 177-186 (1981)

Landriscina C., Gnoni G.V., Quagliariello E.  
 On the mode of action of clofibrate on lipid metabolism. Inhibition of rat liver microsomal fatty acid synthesis. *Biochem. Med.* 12, 356-364 (1975)

Landriscina C., Ruggiero F.M., Gnoni G.V., Quagliariello E.  
 Reduced activity of hepatic microsomal fatty acid chain elongation synthesis in clofibrate - fed rats. *Biochem. Phar.* 26, 1401-1404 (1977)

Lazarow P.B.  
 Three hypolipidemic drugs increase hepatic palmitoyl-coenzyme A oxidation in the rat. *Science* 197, 580 (1977)

Lazarow P.B.  
 Compartmentation of beta oxidation of fatty acids in peroxisomes.  
 In: *Metabolic compartmentation*. H. Sies ed. Academic Press, New York pp 317-329 (1982)

Lazarow P.B., Shio H., Leyroy-Houyet M.A.  
 Specificity in the action of hypolipidaemic drugs: Increase of peroxisomal beta oxidation largely dissociated from hepatomegaly and peroxisome proliferation in the rat. *J. Lipid Res.* 23, 317-326 (1982)

Levine W.G., Ord M.G., Stocken L.A.  
 Some biochemical changes associated with nafenopin-induced liver growth in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 26, 939-942 (1977)

Mackerer C.R., Haettinger J.R.  
 Further studies concerning the effects of clofibrate on respiration and oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 23, 3331-3345 (1974)

Mahley R.W., Angelin B.  
 Type III hyperlipoproteinemia: recent insights into the genetic defect of familial dysbetalipoproteinemia. *Adv. Int. Med.* 29, 385-441 (1984)

Mannaerts G.P., Debeer L.D., Thomas J., De Schepper P.J.  
 Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate treated rats. *J. Biol. Chem.* 254, 4585-4595 (1979)

Meisner H.  
 Displacement of free fatty acids from albumin by chlorophenoxy-isobutyrate. *Molec. Pharmacol.* 13, 224-231 (1977)

Mentlein R., Lembke B., Vik H., Berge R.K.

Different induction of microsomal carboxylesterases, palmitoyl-CoA hydrolase and acyl-L-carnitine hydrolase in rat liver after treatment with clofibrate.

Biochem. Phar. 35, 16, 2727-2730 (1986)

Milton M.N, Elcombe C.R., Kass G.E.N., Gibson G.G.

Lack of evidence for a hepatic peroxisome proliferator receptor and an explanation for the binding of hypolipidemic drugs to liver homogenates.

Biochem. Pharmacol. 37, 5, 793-798 (1988)

Miyazawa S., Furuta S., Hashimoto T.

Induction of a novel long chain acyl-CoA hydrolase in rat liver by administration of peroxisome proliferators.

Eur. J. Biochem. 117, 425-430 (1981)

Monk J.P., Todd P.A.

Bezafibrate: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in hyperlipidemia.

Drugs 33, 539-576 (1987)

Moody D.E., Reddy J.K.

The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, fibric acid and Wy-14,643) on hepatic peroxisomes and peroxisome associated enzymes.

Am. J. Pathol. 90, 435 (1978)

Nagi M.N., Cook L., Ghesquier D., Cinti D.L.

Induction of rat liver mitochondrial fatty acid elongation by the administration of peroxisome proliferator DEHP: absence of elongation activity in peroxisomes.

Arch. Biochem. Biophys. 248, 408-418 (1986)

Nagi M.N., Cook L., Prasad M.N., Cinti D.L.

Site of participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal fatty acid elongation. Electron input in the first reduction step.

J. Biol. Chem. 258, 24, 14823-14828 (1983)

Nagi M.N., Cook L., Prasad M.R., Cinti D.L.

Site of participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal fatty acid chain elongation. Electron input in the first reduction step.

J. Biol. Chem. 258, 24, 14823-14828 (1983)

Nagi M.N., Laguna J.C., Cook L., Cinti D.L.

Disruption of rat hepatic electron transport chains by the selenium-containing anti-inflammatory agent Ebselen.

Arch. Biochem. Biophys. 269, 1, 264-271 (1989)

Nazareth R.I., Sokoloski T.D., Witiak D.T., Hooper A.T.

Biological significance of serum albumin binding parameters determined in vitro for clofibrate-related hypolipidemic drugs: use of 2-(4'-hydroxybenzenazo)benzoic acid to mirror L-thyroxine binding and displacement from serum albumins.

J. Pharm. Sci. 63, 203-211 (1974)



Newton R.S.

Preclinical pharmacological findings with gemfibrozil-effects on hepatic sterol and triglyceride metabolism.

In: Today's therapeutic trends Supl. 1, pp 13-22. Communications Media for Education Inc., Princeton Junction, New Jersey (1985)

Nicoll A., Miller N.E., Lewis B.

High density lipoprotein metabolism.

Adv. Lip. Res. 17, 54-106 (1980)

Nisimoto Y., Otsuka-Murakami H.

Cytochrome b5, cytochrome c and cytochrome P-450 interactions with NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles.

Biochemistry 27, 16, 5869-5876 (1988)

Ochoa S.

Malic enzyme.

in: Methods in Enzymology, Vol. 1 pp 739-753. Colowick S.P., Kaplan N.O. eds. Acad Press N.Y. (1955)

Okerholm R.A., Keeley F.F., Peterson F.E., Glazko A.J.

The metabolism of gemfibrozil.

Proc. Royal Soc. Med. (Suppl. 2) 11-14 (1976)

Oster P., Schlierf G., Lang P.D., Mordasini R., Vollmar J.

Diurnal lipid and lipoprotein profiles with bezafibrate and clofibrate in healthy volunteers.

Pharmatherapeutica 4, 267-277 (1985)

Pauly D.F., MacMillin J.B.

Importance of acyl-CoA availability in interpretation of carnitinepalmitoyltransferase I kinetics.

J. Biol. Chem. 263, 34, 18160-18167 (1988)

Perry R.S.

Contemporary recommendations for evaluating and treating hyperlipidemia.

Clin. Pharm. 5, 113-127 (1986)

Platt D.S., Cockrill B.L.

Biochemical changes in rat liver in response to treatment with drugs and other agents I. Effects of anticonvulsant, anti-inflammatory, hypocholesterolaemic and adrenergic beta-blocking agents.

Biochem. Pharmacol. 18, 429-444 (1969)

Ramsay R.R.

The soluble carnitine palmitoyltransferase from bovine liver. A comparison with the enzymes from peroxisomes and from the mitochondrial inner membrane.

Biochem. J. 249, 239-245 (1988)

Rasmussen J.T., Børchers T., Knudsen J.

Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters.

Biochem. J. 265, 849-855 (1990)

Reddy J.K., Azarnoff D.L., Hignite C.E.

Hypolipidemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens.  
Nature 283, 397-398 (1980)

Reddy J.K., Bunyaratvej S., Svoboda D.

Microbodies in experimentally altered cells. IV. Acatalasemic (CSb) mice treated with clofibrate.  
J. Cell. Biol. 42, 587-596 (1969)

Reddy J.K., Krishnakantha T.P., Azarnoff D.L., Moody D.E.

1-Methyl-4-piperidyl-bis-(p-chlorophenoxy)acetate. A new hypolipide-mic peroxisome proliferator.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 589-592 (1975)

Reddy J.K., Lalwani N.D.

Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidaemic drugs and industrial plasticisers to man.  
CRC Crit. Rev. Toxicol. 12, 1-58 (1983)

Reddy J.K., Lalwani N.D., Reddy M.K., Qureshi S.A.

Excessive accumulation of auto-fluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic peroxisome proliferators.  
Cancer Res. 42, 259-266 (1982 a)

Reddy J.K., Qureshi S.A.

Tumorigenicity of the hypolipidemic peroxisome proliferator ethyl-alfa-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats.  
Br. J. Cancer 40, 476-482 (1979)

Reddy J.K., Rao M.S., Azarnoff D.L., Sell S.

Mitogenic and carcinogenic effect of hypolipidemic peroxisome proliferators (4-chloro-6(2,3-xylidino)-2-pyrimidylthio) acetic acid (Wy-14,643) in rat and mouse liver.  
Cancer Res. 39, 152 (1979)

Reddy J.K., Rao M.S., Moody D.E.

Hepatocellular carcinomas in acatalasemic mice treated with nafenopin a hypolipidemic peroxisome proliferator  
Cancer Res. 36, 1211-1217 (1976)

Reddy J.K., Warren J.R., Reddy M.K., Lalwani N.D.

Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: biological implications.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 368, 81 (1982 b)

Reich N.O., Ortiz de Montellano P.R.

Dissociation of increased lauric acid w-hydroxylase activity from the antilypidemic action of clofibrate.  
Biochem. Pharmacol. 35, 1227 (1986)

Ruegamer W.R., Ryan N.T., Richert D.A., Westerfeld W.W.

The effects of p-chlorophenoxyisobutyrate on the turnover rate and distribution of thyroid hormone in the rat.  
Biochem. Pharmacol. 18, 613-624 (1969)



- Salvador R.A., Haber S., Atkins C., Gommi B.W., Welch R.M.  
Effect of clofibrate and 1-methyl-4-piperidylbis-(p-chloro-  
phenoxy) acetate (Sandoz 43-348) on steroid and drug metabolism by rat liver microsomes.  
*Life Sci.* 9, 397-407 (1970)
- Sedaghat A., Nakamura H., Ahrens E.H. Jr.  
Determination of clofibrate in biological fluids by thin-layer and gas-liquid chromatography.  
*J. Lip. Res.* 15, 352-355 (1974)
- Sharma R., Lake B.G., Foster J., Gibson G.G.  
Microsomal cytochrome P-452 induction and peroxisome proliferation by hypolipidemic agents in rat liver.  
*Biochem. Pharmacol.* 37, 7, 1193-1201 (1988)
- Shepherd J., Packard C.J., Stewart J.M., Atmeh R.F., Clark R.S. et al  
Apolipoprotein A and B (Sf 100-400) metabolism during bezafibrate therapy in hypertriglyceridemic subjects.  
*J. Clin. Invest.* 74, 2164-2177 (1984)
- Shepherd J., Packard C.J.  
Pharmacological approaches to the modification of plasma cholesterol  
*TIPS* 9, 326-329 (1988)
- Smith T.C.  
Toleration and bioavailability of gemfibrozil in healthy men.  
*Proc. Royal Soc. Med.* 69 (suppl 2) 24-67 (1976)
- Srere P.A.  
The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification.  
*J. Biol. Chem* 234, 2544-2547 (1959)
- Stegmeier K., Schmidt F.H., Reinicke A., Fahimi H.D.  
Triglyceride lowering effect and induction of liver enzymes in male rats after administration of hypolipidemic drugs.  
*Ann. n.y. Acad. Sci.* 386, 449-452 (1982)
- Stewart J.M., Packard C.J., Lorimer A.R., Boag D.E., Shepherd J.  
Effects of bezafibrate on receptor-mediated and receptor-independent LDL catabolism in Type II hyperlipoproteinemic subjects.  
*Atherosclerosis* 44, 355-365 (1982)
- Sweetser, D.A., Heuckeroth, R.O., Gordon, J.I.  
The metabolic significance of mammalian fatty-acid-binding proteins: abundant proteins in search of a function.  
*Ann. Rev. Nutr.*, 7, 337-359 (1987)
- Tamura M., Yubisui Y., Takeshita M.  
The opposite effect of bivalent cations on cytochrome b5 reduction by NADH-cytochrome b5 reductase and NADPH-cytochrome c reductase.  
*J. Biol. Chem.* 255, 5184-5189 (1980)

- Taylor K.G., Holdsworth G., Galton D.J.  
Clofibrate increases LPL activity in adipose tissue of hyper triglyceridemic patients.  
*Lancet* 2, 1106-1109 (1977)
- Thomas J.A., Thomas M.J.  
Biological effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate and other phthalic acid esters.  
*CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13, 283-317 (1984)
- Thorp J.M.  
Inter and intra species differences in the binding of anionic compounds to albumin. Toxicological problems of drug combinations.  
*Proc. Eur. Soc. Study Drug Tox.* 13, 98-109 (1972)
- Thorp J.M.  
Experimental evaluation of an orally active combination of androsterone with ethylchlorophenoxyisobutyrate.  
*Lancet*, 1, 1323-1326 (1962)
- Todd P.A., Ward A.  
Gemfibrozil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidemia.  
*Drugs* 36, 314-339 (1988)
- Tosh D., Alberti K.G.M.M., Agius L.  
Clofibrate induces carnitine acyltransferases in periportal and perivenous zones of rat liver and does not disturb the acinar zonation of gluconeogenesis.  
*Biochim. Biophys. Acta* 992, 245-250 (1989)
- Veitch K., Draye J.P., Van Hoof F., Sherrat H.S.A.  
Effects of riboflavin deficiency and clofibrate treatment on the five acyl-CoA dehydrogenases in rat liver mitochondria.  
*Biochem. J.* 254, 477-481 (1988)
- Warren J.R., Simmon V.F., Reddy J.K.  
Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the lymphocyte H<sub>3</sub> thymidine and Salmonella mutagenesis assay.  
*Cancer Res.* 40, 36-41 (1980)
- Westerfeld W.W., Richert D.A., Ruegamer W.R.  
The role of thyroid hormone in the effect of p-chlorophenoxyisobutyrate in rats.  
*Biochem. Pharmacol.* 17, 1003-1016 (1968)
- Wilson D.E., Lee R.S.  
Metabolic relationships among the plasma lipoproteins. Reciprocal changes in the concentrations of VLDL and LDL in man.  
*J.Clin. Invest.* 51, 1051-1060 (1972)
- Williams G.M.  
Liver carcinogenesis: The role for some chemicals of an epigenetic mechanism of liver tumour promotion involving modification of the cell membrane.  
*Food Cosmet. Toxicol.* 19, 577-583 (1981)

Yasukochi Y., Masters B.S.S.

Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c reductase purified by biospecific affinity chromatography.

J. Biol. Chem. 251, 5337-5344 (1976)

Zahler W.L., Cleland W.W.

Studies on the microsomal acylation of L-glycerol-3-phosphate. III. Time course of the reaction.

Biochim. Biophys. Acta 176, 669-703 (1969)