

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y QUIMICA TERAPEUTICA

Programa de Doctorado: Farmacología. Bienio 1990-1992.

**EFFECTO *IN VIVO* DE LOS DERIVADOS FIBRICOS
SOBRE ENZIMAS MICROSOMALES IMPLICADOS EN
LA SINTESIS HEPATICA DE ACIDOS GRASOS**

Tesis que presenta Dña. Marta Alegret Jordà para optar al título de Doctora en Farmacia, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Laguna Egea y siendo tutor el Dr. Tomàs Adzet Porredón.



Barcelona, Octubre 1993.



DISCUSSION

PARAMETROS NO ENZIMATICOS Y β -OXIDACION PEROXISOMICA

Como ya se ha expuesto en el capítulo V de la parte teórica, los fármacos estudiados en este trabajo, clofibrato (CFB), bezafibrato (BFB) y gemfibrozilo (GFB) son moléculas hipolipemiantes pertenecientes al grupo de los proliferadores peroxisómicos (Moody y col., 1992). La proliferación peroxisómica se caracteriza por una gran selectividad de especie, siendo la rata y otros roedores muy sensibles a este fenómeno, mientras que otras especies, como el cobaya o incluso el hombre, son refractarios a él (Driven y col., 1993). Es por ello que en este trabajo se han realizado estudios paralelos en rata y cobaya cuya comparación puede ayudar a discernir los efectos de los fármacos que son meramente consecuencia de la inducción peroxisómica, y que, por tanto, deberían tener escasa relevancia en el hombre, de las acciones independientes de la actividad proliferadora de los fibratos.

Las dos manifestaciones típicas del fenómeno de la inducción peroxisómica son:

- la hepatomegalia, debida a fenómenos de hipertrofia e hiperplasia (Bieri y Lhuguenot, 1993)

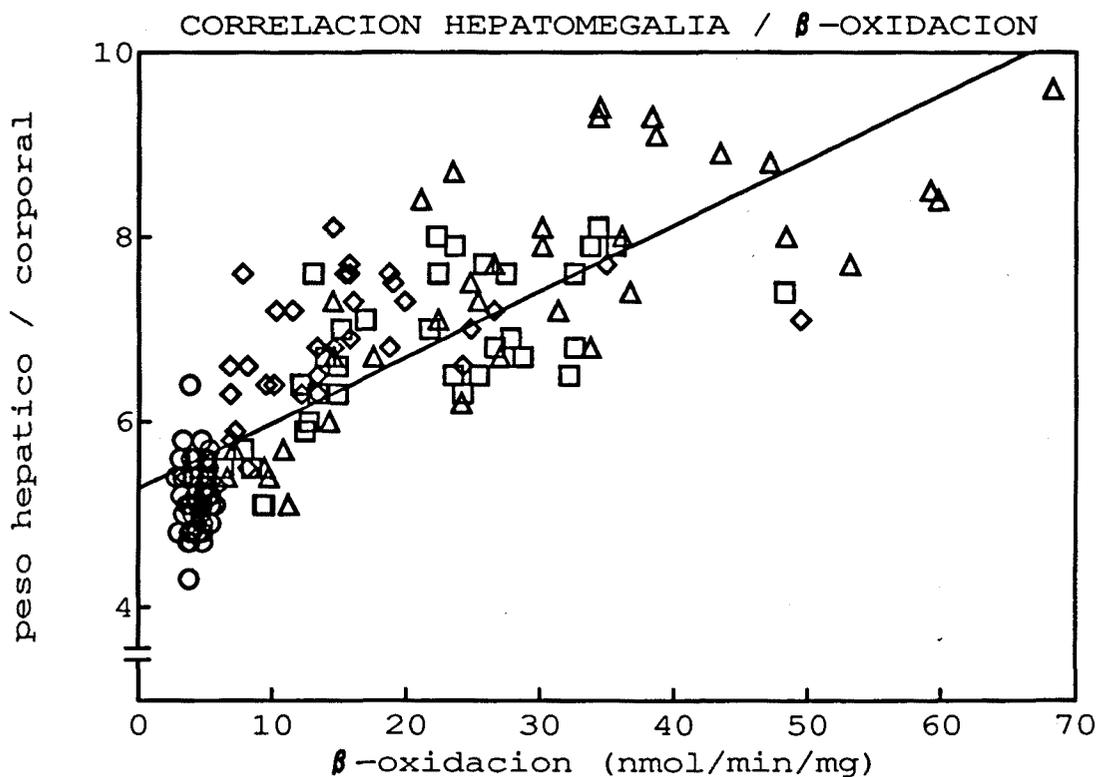
- la inducción de una serie de actividades enzimáticas, entre las cuales se consideran los más importantes marcadores de proliferación peroxisómica la inducción del citocromo P450IVA1 (Driven y col., 1993) y la del sistema de β -oxidación peroxisómica (Reddy y Lalwani, 1983). Según nuestra información, solamente Baumgart y col. (1990) han descrito un compuesto, el BM 15766, capaz de producir proliferación peroxisómica sin inducir la β -oxidación peroxisómica.

Tanto la actividad β -oxidación peroxisómica como el tamaño relativo del hígado se han incrementado de manera muy significativa en las ratas tratadas con fibratos (Tablas y Figuras 3.2 (a y b) y 1.4 (a y b)). En cambio,

ninguno de los dos parámetros ha experimentado modificación tras el tratamiento de cobayas con GFB (ver punto 3.2). Esto, y los resultados obtenidos en la electroforesis del primer sobrenadante de la centrifugación del homogenado hepático, confirma la baja o nula sensibilidad de los cobayas a la inducción peroxisómica. El hecho de que la inducción de la β -oxidación peroxisómica *in vivo* sólo se manifiesta en rata indica que la proliferación peroxisómica no constituye una respuesta adaptativa del organismo a la inhibición de este sistema enzimático producida por los fibratos *in vitro* (Tabla 2.2), ya que ésta tiene lugar tanto en ratas como en cobayas.

Aunque algunos autores (Lazarow y col., 1982) han descrito que el incremento en la β -oxidación puede tener lugar en ausencia de hepatomegalia, se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre la hepatomegalia, expresada como relación de pesos hígado/cuerpo y la β -oxidación peroxisómica en rata en los dos períodos de tratamiento (I y II). Las regresiones obtenidas presentan altos coeficientes de correlación (período I: $y=0.071 (\pm 0.004) x + 5.275 (\pm 0.091)$; $r^2=0.659$; $p<0.001$; $n=149$) período II: $y=0.068(\pm 0.004) x + 5.711(\pm 0.089)$; $r^2=0.664$; $p<0.001$; $n=147$), que indican que la hepatomegalia es consecuencia, como mínimo en un 66 %, de la proliferación peroxisómica.

Si bien el incremento en ambos parámetros parece iniciarse de manera coordinada, la evolución temporal no es exactamente la misma, dado que los máximos se sitúan en el día 7 para la inducción de la β -oxidación peroxisómica, y en el día 4 para la hepatomegalia. Dado que el incremento en las actividades enzimáticas requiere todo un proceso de inducción de la transcripción y traducción de los genes correspondientes (Reddy y col., 1986), es lógico que el máximo de actividad enzimática se produzca de manera más tardía.



Correlación entre hepatomegalia y β -oxidación en ratas del período I. $y=0.071 (\pm 0.004)$
 $x + 5.275 (\pm 0.091)$; $r^2=0.659$; $p<0.001$; $n=149$. (○)Control, (□)CFB, (Δ)BFB, (◇)GFB.

El orden de potencia proliferadora peroxisómica es BFB>CFB>GFB, coincidiendo con el orden hallado en la literatura (McGuire y col., 1991). Aunque algunos autores sostienen que la única relación entre la estructura química y la capacidad proliferadora es la presencia de una función acídica (Boie y col., 1993), otros postulan también la importancia de la halogenación de la molécula (McGuire y col., 1991). Asumiendo esta hipótesis, podría atribuirse la menor potencia como inductor peroxisómico que presenta el GFB a la falta de halogenación de su molécula, a diferencia de CFB y BFB. En particular, los compuestos con un átomo de Cl en la posición 4 del anillo aromático, característica compartida por CFB y BFB, se consideran mejores inductores peroxisómicos que sus análogos no halogenados o fluorados

(Esbenshade y col., 1990), que presentan menor lipofilicidad (Kokuza y col., 1991).

Se ha valorado, para cada período de tratamiento, el incremento ponderal diario de los animales. En ambos períodos, I y II, se ha detectado un menor incremento ponderal de las ratas tratadas respecto a las controles (Tablas 1.1.a y 1.1.b). El efecto detectado no puede ser debido a diferencias en los pesos iniciales de las ratas, dada la extrema homogeneidad de los mismos. Esta diferencia no ha sido descrita hasta el momento, por lo que nosotros sabemos, en la literatura. Así, McGuire y col. (1991), utilizando una cepa de ratas distinta y una menor dosis de BFB, indica una evolución ponderal similar en los grupos control y tratado. Sin embargo, las diferentes características de este estudio hacen difícil su comparación con el nuestro. Existen referencias acerca de otro proliferador peroxisómico no relacionado estructuralmente con los fibratos, el ácido perfluorodecanoico, en que se describen reducciones en el incremento ponderal de las ratas tratadas (Davis y col., 1991). Recientemente se ha publicado un estudio en que se indica que otros proliferadores peroxisómicos similares al anterior, el ácido perfluorooctanoico y su derivado sulfónico, producen pérdida de peso en ratones tratados con estos compuestos (Sohlenius y col., 1993).

Las pérdidas de peso detectadas en ratas tratadas con ácido perfluorodecanoico van acompañadas de un signo claro de toxicidad como es la hipofagia (Borges y col., 1990). En cambio, el menor incremento ponderal detectado en nuestro estudio no se acompaña de ninguna manifestación externa de toxicidad, y, por el contrario, en los grupos de ratas tratadas con BFB y GFB se observa un mayor consumo diario de alimento (Tabla 1.3.a y 1.3.b). Tampoco este comportamiento ha sido descrito para los fibratos en la bibliografía consultada. Así, la dehidroepiandrosterona (DHEA), derivado esteroídico natural capaz de inducir proliferación peroxisómica, produce disminución del peso corporal en ratas tratadas (Cleary, 1990; Sambasiva y col., 1992), aunque no modifica el consumo diario de alimento (McIntosh y

Berdanier, 1991). Una hipótesis propuesta para el caso de la DHEA es que el efecto adelgazante se produce por la inhibición de la actividad glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que, al reducir el aporte de NADPH a los hepatocitos, provoca una reducción de la lipogénesis (Cleary, 1990). Dado que, al menos el GFB, ha demostrado ser un potente inhibidor de la G6PDH *in vitro* (Sánchez y col., 1993a), este mecanismo serviría para explicar la disminución del incremento ponderal detectada en este estudio; sin embargo, no todos los autores han detectado inhibiciones en la actividad de esta enzima en ratas tratadas con DHEA (Yamada y col., 1991).

La explicación más plausible a este fenómeno es que el tratamiento de ratas con fibratos, sobre todo BFB y GFB, induce un ciclo fútil de acilación/reacilación de ácidos grasos que comporta gasto energético (McIntosh y Berdanier, 1991; Cleary, 1990); este argumento puede utilizarse en el caso de los fibratos dado que producen un incremento simultáneo de las actividades acil-CoA sintetasa e hidrolasa (ver Resultados, apartados 3.3 y 3.4). Es posible que el organismo intente compensar este gasto inútil de energía con una mayor ingesta de alimento.

Los efectos de los fibratos sobre estos parámetros pueden estar relacionados, al menos en parte, con la inducción peroxisómica, dado que el BFB, que es el inductor peroxisómico más potente, es el que produce mayor efecto en la disminución del peso corporal; sin embargo, otros factores deben contribuir a estos fenómenos, ya que el GFB, el menos potente como inductor peroxisómico, es el que modifica más intensamente el consumo diario de alimento.

PARAMETROS PLASMATICOS

Los tres fármacos ensayados han demostrado ser efectivos como hipocolesterolemiantes e hipotrigliceridemiantes en ratas normolipidémicas. Este hecho es significativo si se tiene en cuenta que algunos autores

(Harrison, 1984) sostienen que el efecto hipolipemiante de los fibratos sólo se manifiesta en animales que presentan hiperlipoproteinemias, genéticas o inducidas experimentalmente. Nuestros resultados en ratas, muy similares en ambos períodos, I y II, (Tablas 2.1-2.2 a y b) contradicen esta afirmación, aunque podemos aceptar que el efecto de los fibratos sea más potente si los niveles plasmáticos de lípidos son inicialmente elevados. La discrepancia respecto los resultados de Harrison (1984) podría atribuirse a la complejidad de los mecanismos que controlan el nivel de lípidos plasmáticos, que hace que parámetros como la especie animal utilizada, la dieta o incluso la época del año en que se ha llevado a cabo el estudio, puedan modificar la respuesta obtenida.

Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos tras la utilización clínica de estos fármacos; así, el BFB es más eficaz como hipocolesterolémico (Illingworth, 1990), mientras que el GFB tiene mayor efecto en la disminución de los niveles de triglicéridos plasmáticos, y el CFB es menos efectivo que los otros dos como hipotrigliceridemiante o hipocolesterolemiante (Stange y col., 1991; Sepherd y col., 1991).

El orden de potencia hipolipemiante hallado (BFB>CFB>GFB), coincide con el orden de potencia de estos fármacos como inductores peroxisómicos. Por otro lado, de acuerdo con nuestros datos existe una correlación inversa estadísticamente significativa entre la actividad β -oxidación peroxisómica y los niveles plasmáticos de colesterol (período I: $y = -0.864(\pm 0.141) x + 96.461(\pm 2.749)$; $r^2 = 0.248$; $p < 0.0001$; $n = 115$; período II: $y = -0.174(\pm 0.085) x + 87.82(\pm 2.11)$; $r^2 = 0.331$; $p < 0.0001$; $n = 120$) y de triglicéridos (período I: $y = -1.225(\pm 0.24) x + 101.253(\pm 4.696)$; $r^2 = 0.19$; $p < 0.0001$; $n = 113$; período II: $y = -1.741(\pm 0.21) x + 100.45(\pm 3.94)$; $r^2 = 0.2604$; $p < 0.0001$; $n = 120$). En la bibliografía no se han encontrado datos similares referidos a ratas, pero existe un trabajo (Pourbaix y col., 1984) en que se describe una correlación similar entre los niveles plasmáticos de colesterol y la β -oxidación peroxisómica en hamsters. En cambio, en un estudio reciente con dos cepas distintas de ratas, Sprague-

Dawley y Lewis (Pill y col., 1992), aunque el mayor efecto hipolipemiente se produce en ratas Lewis, las más sensibles a la proliferación peroxisómica, no se ha encontrado relación entre la actividad β -oxidación peroxisómica y la disminución de lípidos séricos.

Las correlaciones halladas indican una dependencia del efecto hipolipemiente de los fibratos de su capacidad de inducir proliferación peroxisómica. Sin embargo, el hecho de que en ningún caso la contribución de la β -oxidación peroxisómica al efecto hipolipemiente supere el 30 %, junto con las manifiestas propiedades hipolipemiantes de los fibratos en especies refractarias a la proliferación peroxisómica, como es el caso de la especie humana o los cobayas (Vázquez y col., 1993; Harrison, 1984; Kawashima y col., 1986; Lake y Gray, 1985), descartan una dependencia absoluta. Más bien parecería ser que la proliferación peroxisómica podría tener una acción coadyuvante sobre el efecto hipolipemiente, pero nunca constituiría un prerequisite para este efecto.

PARAMETROS ENZIMATICOS

Palmitoil-CoA hidrolasas

En este trabajo se han estudiado cuatro actividades palmitoil-CoA hidrolasa distintas, localizadas en microsomas, mitocondrias pesadas y ligeras, y citosol. Según la respuesta de cada enzima al tratamiento de ratas con CFB, BFB y GFB, podemos clasificarlos en dos grupos:

- palmitoil-CoA hidrolasas cuya actividad resulta inducida en ratas tratadas con fibratos: son las de localización microsomal (Tabla y Figura 3.3.1) y citosólica (íd. 3.3.2)

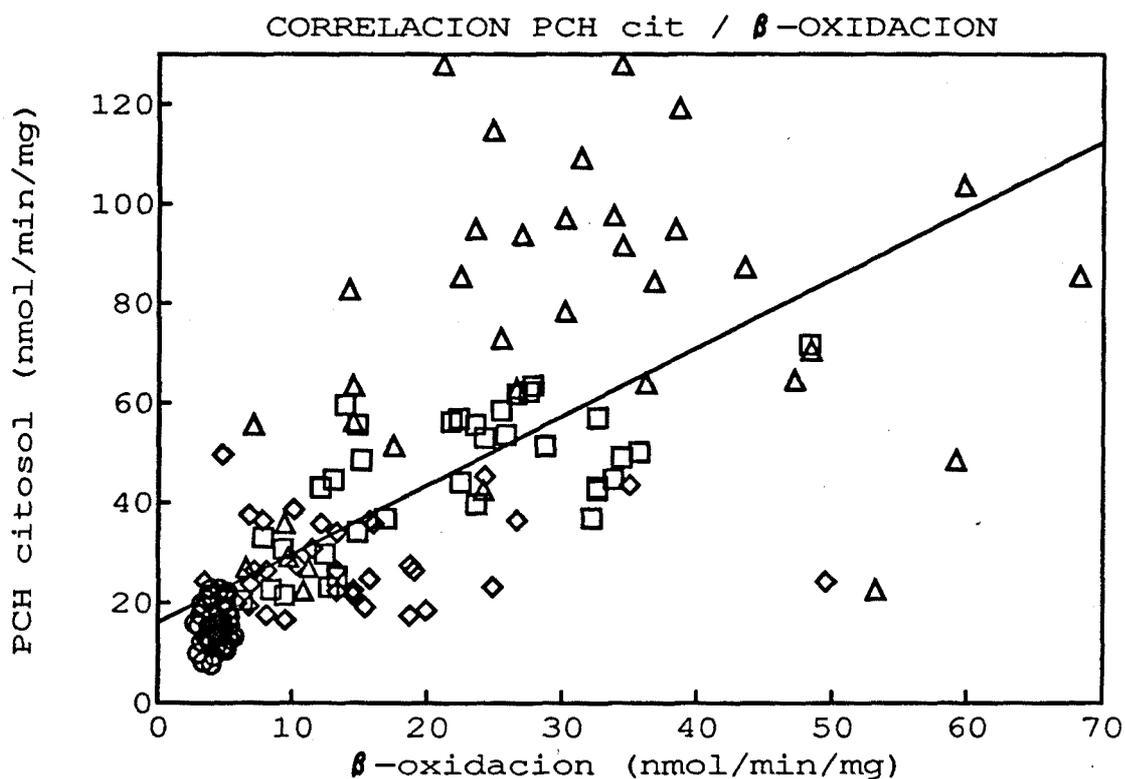
- palmitoil-CoA hidrolasas que no presentan modificaciones significativas en su actividad específica tras este tratamiento: son las de localización mitocondrial (Tablas 3.3.3 y 3.3.4).

Únicamente se han encontrado datos bibliográficos sobre la acción de los fibratos sobre las hidrolasas celulares referidos al tratamiento de ratas con CFB (Kato y col., 1987; Berge y col., 1984). En estos estudios se registra un incremento global de la actividad hidrolasa total hepática que comprende un aumento moderado en la fracción mitocondrial, un comportamiento variable del enzima de localización microsomal y un espectacular incremento en la actividad palmitoil-CoA hidrolasa del citosol.

Según nuestros resultados, la actividad que se induce con mayor intensidad es, en concordancia con los estudios anteriormente citados, la hidrolasa citosólica. El orden de potencia inductora es el mismo que el orden de capacidad de estos fármacos para producir proliferación peroxisómica: BFB>CFB>GFB. Por otro lado, en cobayas tratados con GFB, no se produce ninguna modificación en la actividad de este enzima. Por todo ello no resulta sorprendente que se haya encontrado una fuerte correlación entre la actividad palmitoil-CoA hidrolasa de citosol hepático de rata y la β -oxidación peroxisómica ($y = 1.377(\pm 0.12) x + 15.972(\pm 2.603)$; $r^2 = 0.473$; $p = 0.0001$; $n = 149$). El alto valor de r^2 refleja que como mínimo un 50 % de la inducción de esta hidrolasa es consecuencia de la proliferación peroxisómica. La relación existente entre ambos fenómenos ya ha sido propuesta por otros autores en el caso del CFB (Berge y Aarsland, 1985).

La inducción de las palmitoil-CoA hidrolasas microsomal y citosólica hepáticas tras el tratamiento de ratas con fibratos podría atribuirse a una respuesta compensatoria del organismo, dado que en los estudios realizados *in vitro* estos fármacos han demostrado tener acción inhibitoria (Sánchez y col., 1992). Sin embargo, esta hipótesis no parece muy probable teniendo en cuenta que el orden de potencia inhibitoria *in vitro* (GFB>BFB>CFB) es completamente distinto al encontrado *in vivo* (BFB>CFB>GFB). Además, otras palmitoil-CoA hidrolasas celulares, como la presente en las mitocondrias ligeras, también resultan inhibidas por los fibratos *in vitro* (con el mismo orden que el enzima microsomal: GFB>BFB>CFB), sin que resulten afectadas

tras el tratamiento *in vivo*.



Correlación entre palmitoil-CoA hidrolasa citosólica y β -oxidación en ratas. $y = 1.377(\pm 0.12)x + 15.972(\pm 2.603)$; $r^2 = 0.473$; $p = 0.0001$; $n = 149$. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

Puede observarse que el incremento en la hidrolasa microsomal precede en el tiempo al del enzima citosólico, y que cuando la inducción de éste alcanza el máximo, de forma concomitante se produce un descenso en las actividades de microsomas y mitocondrias ligeras. De este modo, nuestros resultados concordarían con la hipótesis propuesta por Berge y col. (1984) en el sentido de que, al menos en parte, la inducción de la palmitoil-CoA hidrolasa del citosol se debe a la mayor fragilidad de los orgánulos celulares, especialmente peroxisomas, por el tratamiento con fibratos.

Asumiendo esta hipótesis, la menor potencia del GFB como inductor de la palmitoil-CoA hidrolasa citosólica podría deberse a la manifestación del efecto inhibitorio de este fármaco, demostrado *in vitro* (Sánchez y col., 1992a), sobre la hidrolasa microsomal liberada al citosol por la ruptura del orgánulo. Para que esto fuera cierto, debería comprobarse la presencia física de GFB en el citosol de ratas tratadas con este fármaco. Por ello, se procedió a realizar una diálisis del mismo, de modo que si fuera cierta la hipótesis propuesta, la eliminación del fármaco comportaría un aumento en la actividad del enzima. Si se observan los resultados de la Tabla 3.3.6, se aprecia que la actividad palmitoil-CoA hidrolasa del citosol de ratas tratadas con GFB no se modifica tras la diálisis, de modo que la menor potencia inductora de este fármaco parece ser mayoritariamente debida a su menor capacidad como proliferador peroxisómico.

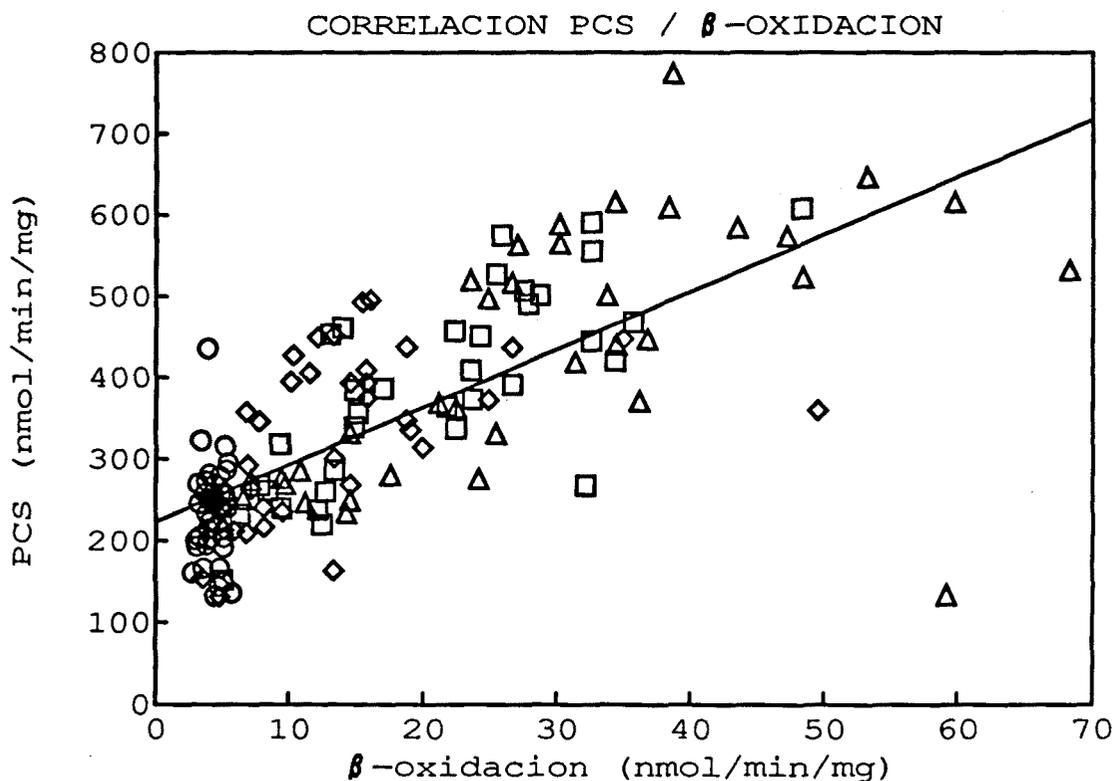
Según Kawashima y col. (1983, 1987), la palmitoil-CoA hidrolasa inducida en citosol hepático tras el tratamiento de ratas con fibratos se resuelve en dos enzimas, denominados por estos autores "hidrolasa I y II". Según estos autores, la hidrolasa I, que representa la actividad mayoritaria, es distinta a la hidrolasa constitutiva del citosol de hígado de rata y prácticamente idéntica a la hidrolasa constitutiva del citosol de cerebro de rata. Teniendo en cuenta que la actividad hidrolasa citosólica cerebral no se modifica por la adición de fibratos *in vitro* (Sánchez y col., 1992a), la actividad hidrolasa I tampoco debería ser inhibida por la adición de fibratos *in vitro*. Para comprobar esta hipótesis, se ensayó el efecto de la adición de CFB, BFB y GFB al citosol hepático de ratas tratadas con estos fármacos. Si se observa la Tabla 3.3.5, puede comprobarse que en el caso de la actividad palmitoil-CoA hidrolasa citosólica de ratas tratadas con GFB, el efecto inhibitorio *in vitro* de los fármacos se limita a la hidrolasa constitutiva, que sería la actividad en ratas control, 11.5 nmol/min/mg de proteína (esta actividad más la actividad inhibida por la adición *in vitro* de los fármacos, proporciona exactamente el valor correspondiente al citosol control obtenido de ratas tratadas con GFB, 25.5 nmol/min/mg). En el caso de las ratas tratadas con

BFB o CFB, la fuerte inducción de la hidrolasa I hace prácticamente despreciable la contribución de la hidrolasa constitutiva, por lo que el efecto inhibitorio de los fármacos adicionados *in vitro* no se pone de manifiesto. Por tanto, los resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis propuesta por Kawashima y colaboradores.

Palmitoil-CoA sintetasa

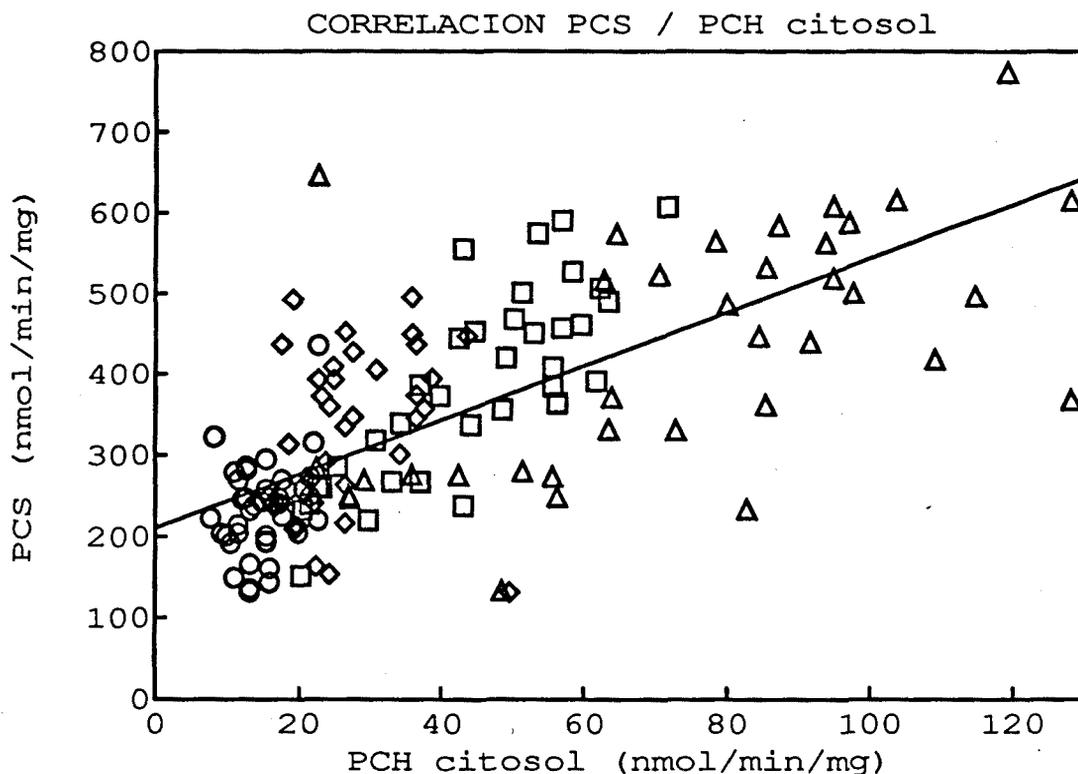
La actividad palmitoil-CoA sintetasa microsomal resulta enormemente inducida en ratas tras la administración de fibratos (Tabla y Figura 3.4), siendo el orden de potencia para este efecto (BFB>CFB>GFB) idéntico al orden de potencia para la proliferación peroxisómica. En este sentido, se ha encontrado que existe una correlación muy fuerte entre la actividad palmitoil-CoA sintetasa microsomal y la β -oxidación peroxisómica ($y = 7.065(\pm 0.546) x + 222.898(\pm 11.807)$; $r^2 = 0.535$; $p = 0.0001$; $n = 147$). La relación entre ambos fenómenos resulta confirmada por el hecho de que la actividad palmitoil-CoA sintetasa no resulta modificada por el tratamiento de cobayas, especie refractaria a la inducción peroxisómica, con GFB.

La inducción de la actividad palmitoil-CoA sintetasa en microsomas de ratas tratadas con CFB ya ha sido descrita por otros autores (Yoshida y Singh, 1990). Respecto al mecanismo por el cual se produce esta inducción enzimática, parece poco probable que se trate de una reacción compensatoria del organismo a la inhibición detectada *in vitro* (Sánchez y col., 1992b); las CI_{50} calculadas en rata son demasiado altas para tener repercusión fisiológica. Una posible explicación para la inducción de la sintetasa es que es debida a la sobrecarga de substrato, ácidos mono y dicarboxílicos que comporta el fenómeno de proliferación peroxisómica (Hawkins y col., 1986), así como al hecho de que los propios fármacos administrados son substratos de este enzima (Bronfman y col., 1986).



Correlación entre palmitoil-CoA sintetasa y β -oxidación en ratas. $y = 7.065(\pm 0.546) x + 222.898(\pm 11.807)$; $r^2 = 0.535$; $p = 0.0001$; $n = 147$. (o) Control, (□) CFB, (Δ) BFB, (◇) GFB.

Es necesario tener en cuenta la relación existente entre la inducción por tratamiento con fibratos de las actividades palmitoil-CoA sintetasa e hidrolasa. Por un lado, se ha encontrado una fuerte correlación entre ambas actividades ($y = 3.340(\pm 0.283) x + 210.034(\pm 13.643)$; $r^2 = 0.488$; $p < 0.0001$; $n = 148$). Además, puede comprobarse que el máximo de activación de la hidrolasa citosólica precede en el tiempo al de la palmitoil-CoA sintetasa. La cantidad de acil-CoAs presente en un determinado tejido depende del equilibrio establecido entre las velocidades sintética e hidrolítica (Waku, 1992). Calculando las actividades palmitoil-CoA sintetasa e hidrolasa por



Correlación entre palmitoil-CoA sintetasa y palmitoil-CoA hidrolasa citosólica. $y = 3.340(\pm 0.283) x + 210.034(\pm 13.643)$; $r^2=0.488$; $p<0.0001$; $n=148$. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

gramo de hígado se observa que el balance existente en ratas control se descompensa rápidamente al tratar el animal con fibratos, predominando la actividad hidrolasa. Así, por ejemplo las ratas control presentan actividades hidrolasa y sintetasa de 1263 y 1475 nmol/min/g de hígado, respectivamente, en el 2º día de tratamiento con BFB, el más potente inductor peroxisómico, las actividades son de 4409 y 2975 nmol/min/g de hígado. Por todo ello resulta lógico deducir que la inducción de la palmitoil-CoA sintetasa constituye una respuesta compensatoria del organismo al incremento de actividad hidrolasa para mantener el nivel necesario de acil-CoAs en el hígado. Así pues, la explicación más plausible a la inducción de la sintetasa es, como se ha

comentado anteriormente, la de la existencia una sobrecarga de sustrato para este enzima. La fuerte correlación hallada con la β -oxidación no implicaría, pues, una dependencia directa de la inducción de la sintetasa y la proliferación peroxisómica, sino que más bien reflejaría la correlación de este fenómeno con la inducción de la hidrolasa.

Sistemas de elongación microsomal

El tratamiento de ratas con CFB, BFB y GFB produce un marcado incremento en la actividad palmitoil-CoA elongasa (Tabla y Figura 3.5.1), mientras que la elongación de palmitoleoil-CoA sólo se induce significativamente tras el tratamiento con GFB (Tabla y Figura 3.5.2). Ninguno de los tres fármacos es capaz de modificar la elongación de gamma-linolenil-CoA (Tabla 3.5.3). En cambio, la elongación microsomal en cobaya resulta inducida de forma significativa tras el tratamiento con GFB sea cual sea el sustrato utilizado.

La información bibliográfica referente a los efectos de los fibratos sobre la elongación microsomal de ácidos grasos resulta bastante contradictoria. Así, Landriscina y col. (1977) muestran que tras el tratamiento de ratas con CFB durante 14 días disminuye la actividad de elongación. Por el contrario, Kawashima y col. (1984), utilizando el mismo fármaco, indican una inducción de la elongación de palmitoil-CoA sin que se modifique la de sustratos poliinsaturados. La posible explicación de esta discrepancia es la utilización de acetil-CoA en el primero de estos trabajos, el cual no es sustrato específico para la elongación, mientras que en el segundo se han utilizado los verdaderos sustratos del sistema, como por ejemplo palmitoil-CoA. Nuestros resultados concuerdan con los del grupo de Kawashima (Kawashima y col., 1985 y 1990).

La existencia de al menos dos enzimas de condensación en los microsomas hepáticos de rata, con distinta especificidad de sustrato, parece

probada (Sprecher, 1981; Suneja y col., 1990). Estas enzimas canalizarían distintos productos de condensación hacia los tres enzimas finales de la elongación, comunes para todo tipo de sustratos. Prasad y col. (1986), han propuesto la existencia de tres enzimas de condensación microsomales en hígado de rata, específicos para CoA ésteres de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. De acuerdo con esta hipótesis, los sustratos utilizados en este trabajo han sido palmitoil-CoA (16:0-CoA), palmitoleoil-CoA (16:1-CoA) y gamma-linolenil-CoA (18:3-CoA).

La primera observación que se desprende de los resultados obtenidos en este estudio es que la actividad elongasa en hígado de rata se incrementa al aumentar el número de insaturaciones del sustrato. Así, la media de las actividades obtenidas en ratas control son 0.65, 1.6 y 2 nmol/min/mg de proteína microsomal para la elongación con palmitoil-, palmitoleoil- y gamma-linolenil-CoA, respectivamente. Estos valores son ligeramente inferiores a los hallados en las referencias bibliográficas (Bernert y Sprecher, 1977; Prasad y col., 1986), aunque el orden de actividad según el tipo de sustrato utilizado coincide con el nuestro. En cobaya, mientras que la elongación de sustratos saturados es del mismo orden que la observada en rata (alrededor de 0.7 nmol/min/mg de proteína microsomal), la actividad con sustratos insaturados es menor que la correspondiente en rata. Así, la actividad de elongación de sustratos monoinsaturados es prácticamente idéntica a la hallada para sustratos saturados (0.7 nmol/min/mg de proteína), mientras que la elongación de ácidos grasos poliinsaturados, a diferencia de lo que ocurre en rata, es la que presenta una menor actividad específica (0.53 nmol/min/mg de proteína).

Los resultados obtenidos en rata están en concordancia con la hipótesis de la existencia de tres sistemas de elongación diferentes si tenemos en cuenta:

- Si la elongación de sustratos saturados y monoinsaturados dependiera del mismo sistema enzimático, sería lógico esperar un porcentaje

de inducción por el tratamiento con fibratos similar para ambas actividades. En cambio, en las Tablas 3.5.1 y 3.5.2 se observa que CFB y BFB únicamente inducen la palmitoil-CoA elongasa sin modificar de forma significativa la elongación de palmitoleoil-CoA.

- De igual modo, el distinto efecto del tratamiento de ratas con GFB, que provoca la inducción de la elongación de palmitoleoil-CoA sin modificar la de gamma-linolenil-CoA lleva a la conclusión de que también la elongación de ácidos grasos mono y poliinsaturados está catalizada por sistemas enzimáticos distintos.

En segundo lugar, la observación de los resultados obtenidos permite evidenciar el comportamiento diferencial del GFB respecto a los otros dos fibratos, comportamiento ya comentado en esta discusión para otros efectos de estos fármacos. En este caso, la diferencia reside en el hecho de que el tratamiento de ratas con CFB y BFB únicamente provoca la inducción de la elongación de substratos saturados, mientras que el GFB es también capaz de inducir la elongación de substratos monoinsaturados.

En los estudios realizados en rata *in vitro*, la elongación microsomal resulta fuertemente inhibida por GFB y, en menor grado, por BFB (Sánchez y col., 1993b); en cambio, como hemos visto, el tratamiento de ratas con estos fármacos provoca la inducción del sistema, al menos cuando se utiliza un substrato saturado. El efecto opuesto de los fibratos *in vitro* e *in vivo* se podría explicar si se considera la inducción que se produce tras la administración del fármaco como una respuesta compensatoria del organismo a la inhibición que se produce sobre la actividad enzimática; este sería el caso, por ejemplo, de las estatinas, que inhiben fuertemente la hidroximetilglutaril-CoA reductasa *in vitro* y la estimulan *in vivo* (Endo, 1986).

Sin embargo, resulta más complicado dar una explicación al hecho de que mientras que el efecto *in vitro* tiene lugar independientemente del substrato utilizado, la administración *in vivo* de estos fármacos produce un

efecto distinto sobre la elongación según el sustrato. Para comprender este punto, debe tenerse en cuenta que la actividad de elongación de gamma-linolenil-CoA se encuentra al máximo de sus posibilidades de expresión en ratas control. Esto se deduce del hecho de que cuando se realiza una intervención dietética, como es la administración de dietas libres en grasas, que se conoce que estimula al máximo los sistemas de elongación de ácidos grasos (Ludwig y Sprecher, 1979), las actividades de elongación obtenidas para los tres sustratos están alrededor de 2 nmol/min/mg de proteína (Sánchez y col., 1992b), actividad aproximadamente igual a la gamma-linolenil-CoA elongasa en ratas control. Asumiendo que la elongación de ácidos grasos poliinsaturados está ya expresada al máximo, es explicable que ninguno de los fármacos ensayados sea capaz de incrementar más esta actividad. Respecto a la elongación de sustratos saturados y monoinsaturados, únicas actividades susceptibles de ser inducidas, el único fármaco capaz de hacerlo es el GFB, ya que es el inhibidor *in vitro* más potente. En cambio, en el caso de CFB y BFB, al ser mucho menos potentes como inhibidores, el efecto compensador del organismo sólo se pone de manifiesto en aquella actividad más baja, y por tanto, la más afectada por este efecto inhibidor, la elongación de ácidos grasos saturados.

Kawashima y col. (1990) consideran que la inducción de la elongación microsomal de palmitoil-CoA tras la administración de CFB a ratas está directamente relacionada con el fenómeno de la inducción peroxisómica. Tras determinar la correlación existente entre esta actividad enzimática y la β -oxidación peroxisómica, se obtiene un coeficiente de correlación relativamente bajo ($y = 0.0229(\pm 0.0033) x + 0.8448(\pm 0.0752)$; $r^2 = 0.2925$; $p < 0.0001$; $n = 141$), que indica una contribución de alrededor de un 30 % de la inducción peroxisómica al fenómeno del incremento en la actividad de elongación de sustratos saturados. Por otro lado, según nuestros resultados parece claro que la inducción de la elongación de palmitoleoil-CoA es totalmente independiente de este fenómeno, pues el único fármaco capaz de inducir esta actividad, el GFB, es justamente el de menor potencia como proliferador peroxisómico; si

se consideran los datos de los animales tratados con este fármaco el valor de r^2 obtenido de la correlación entre la actividad palmitoleoil-CoA elongasa y la β -oxidación peroxisómica es 0.

La escasa o nula dependencia entre la acción de los fibratos como proliferadores peroxisómicos y su capacidad para inducir las actividades de elongación microsomal, se evidencia también por el hecho de que la administración de GFB a cobayas produce la inducción de este sistema, sea cual sea el substrato utilizado, sin que se produzca proliferación peroxisómica. El hecho de que en cobaya el GFB sea capaz de inducir los tres sistemas de elongación podría indicar que en esta especie animal dichas actividades no se encuentran expresadas al máximo de sus posibilidades.

Como se ha señalado, el fenómeno de la proliferación peroxisómica contribuye, en un porcentaje aproximado de un 30 %, al incremento en la actividad de elongación de ácidos grasos saturados. Teniendo en cuenta que, como se comentará en el siguiente punto, el tratamiento con fibratos produce en rata un incremento de la actividad delta-9 desaturasa, fuertemente dependiente de la inducción peroxisómica, la inducción de la elongación de ácidos grasos saturados podría ser consecuencia del incremento de demanda de substrato para la delta-9 desaturasa. Esto explicaría la relación existente entre los incrementos en la elongación de palmitoil-CoA y en la β -oxidación, pues ambos fenómenos estarían relacionados, aunque de forma indirecta, a través de la delta-9.

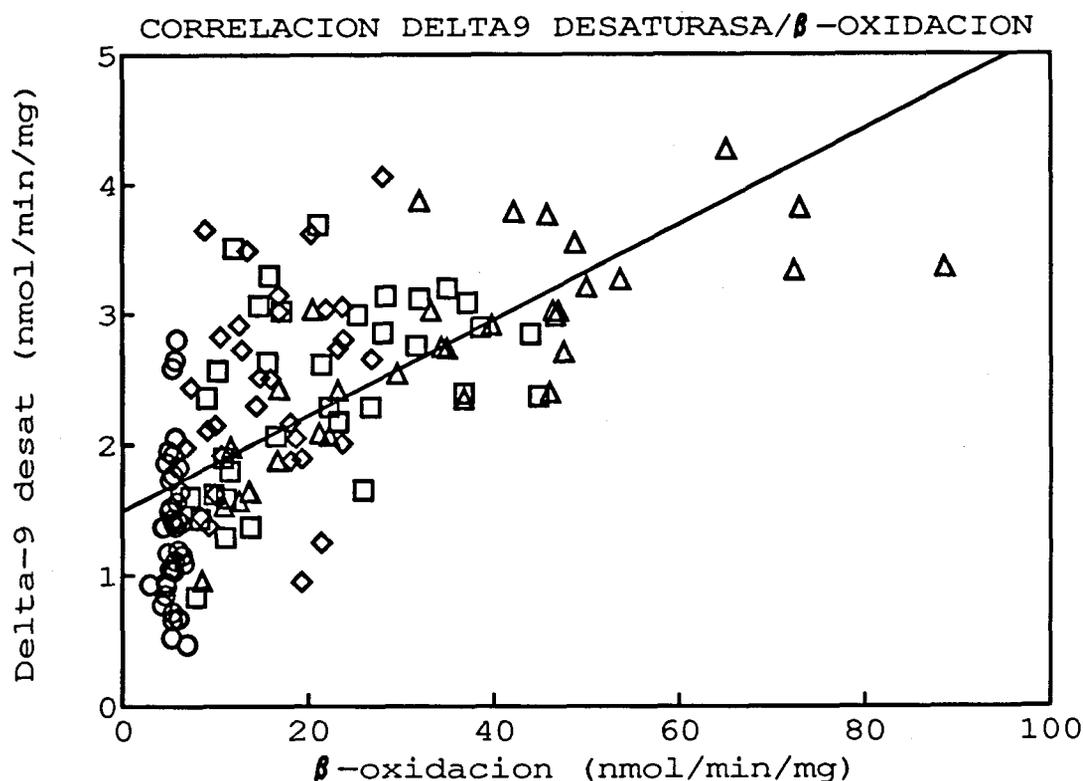
Sistemas de desaturación microsomal

El tratamiento de ratas con CFB, BFB y GFB produce un marcado incremento en las actividades delta-9, delta-5 y delta-6 desaturasa (Tablas y Figuras 3.6.1, 2 y 3). Tanto la actividad basal de estos tres sistemas

enzimáticos, como el orden de magnitud de ésta ($\delta\text{-}9 > \delta\text{-}5 > \delta\text{-}6$) coinciden con lo descrito por otros autores (Christiansen y col., 1991). En cobaya, la baja actividad de estas enzimas ha hecho muy difícil valorar su actividad por los métodos a nuestro alcance, por lo que solamente hemos podido obtener resultados en el caso de la $\delta\text{-}9$ desaturasa, cuya actividad no resulta significativamente modificada tras el tratamiento con GFB. El hecho de no haber detectado actividad $\delta\text{-}5$ y $\delta\text{-}6$ desaturasa en cobayas tratados con GFB podría indicar que este fármaco no ha sido capaz de inducir estas enzimas, al menos de forma apreciable según nuestros métodos de valoración.

La inducción de la actividad $\delta\text{-}9$ desaturasa por fibratos ya ha sido descrita por Kawashima y Kozuka (1982) para el caso del CFB. Sin embargo, la inducción hallada por este autor (4 veces la actividad control) es mucho mayor que la que nosotros hemos encontrado (2.7 veces la actividad control). La diferencia de magnitud puede ser explicada por la utilización de una cepa distinta de ratas (Wistar) y de una dosis mayor de fármaco (0.5 % p/p).

El orden de potencia de los fibratos para la inducción de la actividad $\delta\text{-}9$ desaturasa es $\text{BFB} > \text{CFB} = \text{GFB}$, siendo el mayor inductor de esta actividad enzimática el más potente proliferador peroxisómico de los tres ensayados. El hecho de que no exista inducción en una especie como el cobaya, sugiere que debe existir una estrecha dependencia entre este fenómeno y la proliferación peroxisómica. Esta dependencia se confirma por la existencia de una buena correlación entre ambos parámetros ($y = 0.03675 (\pm 0.0035) x + 1.49 (\pm 0.087)$; $r^2 = 0.4454$; $n = 139$; $p < 0.001$). El alto valor de r^2 obtenido resulta aún más alto si se consideran únicamente los datos correspondientes a las ratas tratadas con BFB, el más potente inductor peroxisómico: $y = 0.03 (\pm 0.0046) x + 1.629 (\pm 0.19)$; $r^2 = 0.5884$; $n = 32$; $p < 0.0001$.

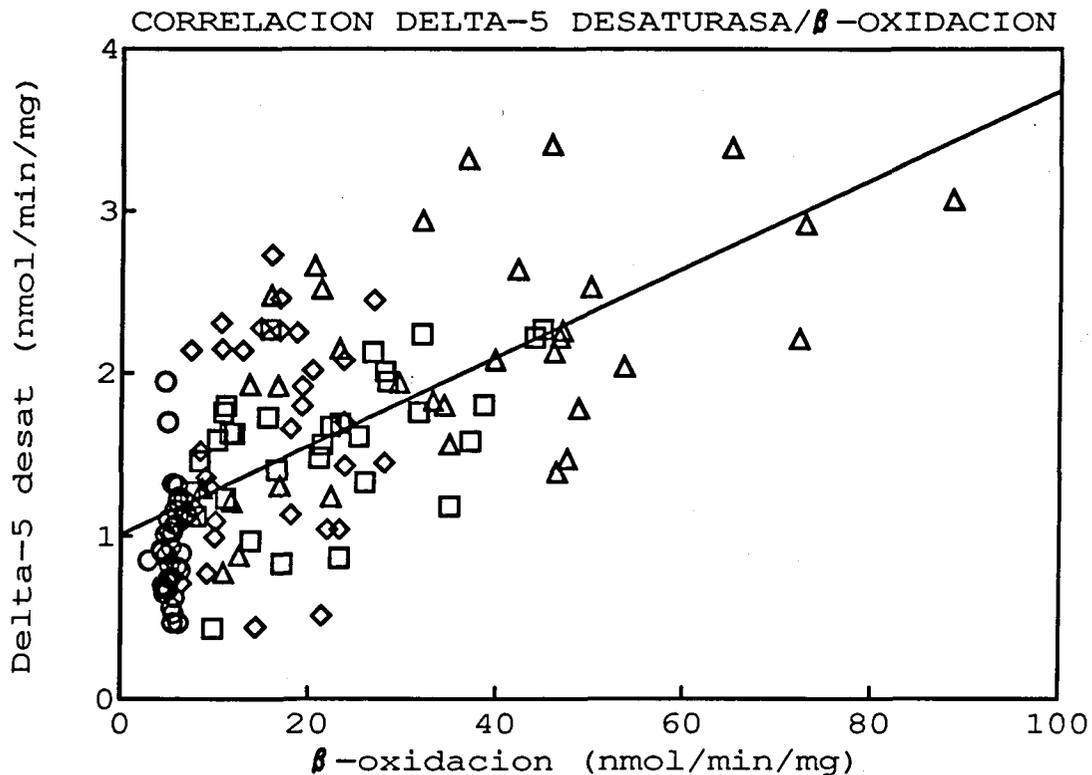


Correlación entre delta-9 desaturasa y β -oxidación en ratas. $y = 0.3675 (\pm 0.0035) x + 1.49 (\pm 0.087)$; $r^2 = 0.4454$; $n = 139$; $p < 0.001$. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

También soportan esta hipótesis, propuesta otros autores (Kawashima y col., 1990), los datos obtenidos *in vitro*. En los estudios realizados en nuestro laboratorio (Sánchez y col., 1993b) se demostró que ninguno de los tres fármacos era capaz de inhibir *in vitro* esta actividad enzimática en rata, lo cual descarta que la inducción se produzca por un mecanismo similar al descrito para la elongación. Sin embargo, el hecho de que el GFB, siendo un proliferador peroxisómico más débil que el BFB, sea capaz de estimular la actividad delta-9 desaturasa de forma mucho más rápida (significativamente ya desde el primer día de tratamiento), implica que, al menos en una pequeña proporción, en la inducción de este sistema enzimático contribuye también

la sobrecarga de sustrato producida por el incremento de la elongación de ácidos grasos saturados.

Respecto a la delta-5 desaturasa, podemos decir que su comportamiento es muy similar al descrito para la delta-9 desaturasa, pues su actividad se incrementa de manera notable tras la administración de fibratos a ratas. Otros autores (Kawashima y col, 1990), han descrito también incrementos en la desaturación de ácido dihomo-gamma-linolénico tras la administración de CFB a ratas. Al igual que en el caso de la delta-9, el orden de potencia para la inducción de la delta-5 desaturasa es BFB>CFB=GFB, y existe una fuerte correlación entre la actividad de este sistema enzimático y la β -oxidación peroxisómica ($y = 0.038(\pm 0.09) x + 1.434$; $r^2=0.4253$; $n=137$; $p<0.001$).



Correlación entre delta-5 desaturasa y β -oxidación en ratas. $y = 0.038(\pm 0.09) x + 1.434$; $r^2=0.4253$; $n=134$; $p<0.001$. (○)Control, (□)CFB, (△)BFB, (◇)GFB.

A diferencia del caso anterior, la inducción producida por la administración de GFB no puede adscribirse a la sobrecarga de sustrato, dado que la elongación de ácidos grasos poliinsaturados no resulta modificada por la administración de fibratos en rata. Por otro lado, aunque el GFB ejerce un ligero efecto inhibitorio sobre este enzima *in vitro* (Sánchez y col., 1993b), dada la actividad basal de la delta-5 desaturasa en rata, relativamente alta, es poco probable que este efecto sea el responsable del fenómeno inductivo.

Respecto a la inducción de la actividad delta-6 desaturasa por la administración de fibratos en rata, parece ser que responde a un fenómeno totalmente distinto al descrito para las otras dos desaturasas estudiadas. En este caso, no existe ninguna correlación entre la actividad desaturasa y la β -oxidación peroxisómica. Igualmente, el orden de potencia inductiva hallado (GFB>BFB=CFB), implica que el proliferador peroxisómico menos potente es el que induce con mayor intensidad la actividad delta-6 desaturasa. Una posible explicación al incremento en esta desaturasa sería que éste constituye una respuesta compensatoria del organismo ante la inhibición *in vitro* del sistema, que se produce con un orden de potencia igual al descrito para el efecto *in vivo* (Sánchez y col., 1993b). Esta explicación resulta plausible teniendo en cuenta que aunque las inhibiciones halladas en los estudios *in vitro* no son tan fuertes como las descritas para la elongación, la baja actividad basal de la delta-6 desaturasa (0.1-0.2 nmol/min/mg de proteína), posibilita que una pequeña inhibición sea capaz de provocar una inducción compensatoria de este enzima.

Como ya se ha expuesto en la parte teórica de este trabajo, los sistemas de desaturación son complejos constituidos por tres proteínas: NADH citocromo b_5 reductasa, citocromo b_5 y desaturasa terminal o factor sensible al cianuro (Jeffcoat, 1979). Tal como se observa en la Tabla 5.7.1, ninguno de los tres fármacos estudiados es capaz de modificar la actividad NADH citocromo b_5 reductasa tras su administración a ratas. Por otro lado, aunque

no hemos determinado el contenido en citocromo b_5 , podemos asumir que este no se modifica por el tratamiento de ratas con fibratos (Kawashima y Kozuka, 1982). Por ello, parece ser que el único componente de los sistemas de desaturación que resulta afectado por estos fármacos es la desaturasa terminal.

Existen dos enzimas microsomales, la acil-CoA sintetasa y la acil-CoA hidrolasa, de cuyo balance depende la cantidad de acil-CoAs, y por tanto, de substratos para la elongación y la desaturación, que existe en un determinado órgano (Waku, 1992). Es por ello que, a priori, puede pensarse que una inhibición en la actividad acil-CoA hidrolasa y/o una inducción en la sintetasa, produzca un incremento en la cantidad de acil-CoAs que sea responsable, al menos en alguna proporción, de la inducción de las actividades de elongación y desaturación.

Respecto a la actividad acil-CoA sintetasa, su posible efecto puede ser obviado en el caso de la elongación y de la delta-9 desaturasa, pues se han utilizado como substratos de las reacciones los derivados CoA y no los correspondientes ácidos grasos; así pues, las modificaciones en la actividad sintetasa únicamente podrían afectar las actividades delta-5 y delta-6 desaturasa. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento de ratas con fibratos produce una marcada inducción de la sintetasa, la actividad específica de este enzima es del orden de 10^2 - 10^3 veces más alta que la de las desaturasas, tanto en microsomas de ratas control como tratadas. Dado que la actividad sintetasa está ya en exceso en ratas control, su incremento no puede repercutir en la inducción de las desaturasas.

El mismo razonamiento puede aplicarse a la actividad acil-CoA hidrolasa, cuya inducción evidentemente no produce inhibición de las elongasas y desaturasas, actividades que experimentan justo el fenómeno contrario.

CADENAS DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL

El retículo endoplasmático del hepatocito posee dos cadenas de transporte electrónico (Nagi y col., 1986 b). En este estudio se han valorado las actividades enzimáticas NADH citocromo b_5 reductasa, que consiste en el paso de electrones desde el NADH a la flavoproteína y al aceptor artificial, el ferricianuro, la NADH citocromo c reductasa, que valora además la transferencia electrónica del citocromo b_5 al c, y la NADPH citocromo c reductasa, en que los electrones fluyen desde el NADPH a la reductasa y de allí al citocromo c. De las tres actividades enzimáticas valoradas, únicamente la NADH citocromo b_5 reductasa no ha resultado modificada por la administración de fibratos a ratas (ver tabla 3.7.1).

NADH citocromo c reductasa

La actividad NADH citocromo c reductasa ha resultado disminuida en ratas tratadas con fibratos (Tabla 3.7.2), con un orden de potencia CFB=BFB>>>GFB. Los resultados descritos están en coincidencia con los de otros autores (Kawashima y col., 1986). De todos modos, la bibliografía consultada resulta contradictoria, pues un mismo equipo investigador (Kawashima y col. 1989 a y b), en dos trabajos publicados en el mismo año, indica en uno de ellos una inhibición similar a la descrita en este estudio, y en otro ausencia de efecto, utilizando en ambos casos ratas Wistar macho tratadas con CFB al 0.5 % p/p durante 7 días.

Por otro lado, en los estudios *in vitro* realizados en este laboratorio (Alegret y col., 1991), la NADH citocromo c reductasa ha sido el único enzima de las cadenas de transporte electrónico afectado por los fibratos.

La falta de correlación estadística entre la NADH citocromo c reductasa y la β -oxidación peroxisómica, indica la independencia del efecto detectado respecto al fenómeno de la inducción peroxisómica. En cobayas tratados con

GFB se observa, al igual que en ratas, una tendencia hacia la reducción de la actividad NADH citocromo c reductasa, aunque en ninguno de los dos casos se alcanza la significación estadística. Por otra parte, el efecto *in vitro* del gemfibrozilo sobre ambas especies también coincide, registrándose en ambos casos una tendencia a la estimulación de esta actividad enzimática. Esta similitud de comportamiento entre dos especies, de las cuales una es sensible y la otra refractaria a la inducción peroxisómica refuerza la hipótesis de que la disminución de la actividad NADH citocromo c reductasa no depende de la capacidad de producir proliferación peroxisómica.

Puede proponerse un mecanismo que explicaría cómo se produce la reducción de la actividad NADH citocromo c reductasa, teniendo en cuenta los datos de los estudios *in vitro* (Alegret y col., 1991). La inducción de esta actividad enzimática en rata tras la adición de fibratos al medio de incubación parece ser debida, de acuerdo con los estudios cinéticos realizados, a dos fenómenos contrapuestos:

- el impedimento del transporte electrónico desde la flavoreductasa al citocromo b_5
- el incremento en el flujo electrónico del citocromo b_5 al aceptor artificial, citocromo c

Así, en presencia de citocromo c, esta dificultad en el flujo electrónico se compensaría, de modo que el efecto final observable sería un incremento del transporte electrónico. De todos modos, el fenómeno real que se produciría *in vivo* es el primero, dado que no depende de la presencia de aceptores de electrones exógenos al sistema. Además, teniendo en cuenta que el tratamiento con CFB no modifica el contenido en citocromo b_5 de los microsomas hepáticos de rata (Kawashima y col., 1986) y que la actividad NADH citocromo b_5 reductasa no ha resultado alterada (Tabla 3.7.1) parece lógico que la reducción en la actividad NADH citocromo c reductasa fuera debida a una interacción directa de los fármacos con el citocromo b_5 . Así pues, la reducción de esta actividad enzimática sería debida al predominio del

efecto de impedimento del transporte electrónico desde la NADH citocromo b_5 reductasa al citocromo b_5 .

La menor potencia inhibidora del GFB no se relaciona con el hecho de que sea el fármaco de menor capacidad proliferadora peroxisómica, pues, como ya se ha dicho, ambos fenómenos son independientes entre sí, sino que podría explicarse por el hecho de ser el fármaco más potente como inductor de esta actividad enzimática *in vitro*. Teniendo en cuenta que el GFB es el único de los fibratos estudiados que puede acumularse en el hígado (Todd y Ward, 1988), y que su interacción con este sistema de transporte electrónico sólo es eliminable por diálisis y no por centrifugación de los microsomas (Alegret y col., 1991), es factible que el efecto de estimulación del paso de electrones hacia el citocromo c se manifieste también en las muestras microsomales provenientes de los animales tratados *in vivo*. De esta manera, la presencia en el ensayo de citocromo c constituiría, en el caso del GFB, un artefacto que compensaría el verdadero efecto inhibidor de los fibratos.

NADPH citocromo c reductasa

La actividad NADPH citocromo c reductasa resulta inducida de forma muy significativa tras el tratamiento de ratas con fibratos (Tabla 3.7.3), efecto ya descrito en el caso del CFB (Facino y Carini, 1981). En cambio, otros autores (Kozuka y col., 1991) no han logrado evidenciar tal inducción en ratas tratadas con CFB, y en el caso del BFB únicamente detectan una ligera inducción tras 79 semanas de tratamiento. Las discrepancias entre nuestros resultados y este trabajo podrían explicarse por el uso de una cepa de ratas y una vía de administración del fármaco diferentes.

El orden de potencia para la inducción de la NADPH citocromo c reductasa sigue el mismo patrón que el descrito para la proliferación peroxisómica, siendo el BFB el más efectivo para ambos efectos. La dependencia de ambos fenómenos concuerda con el hecho de que tras el

tratamiento de cobayas con GFB no se registra ningún efecto sobre la actividad NADPH citocromo c reductasa, la cual tampoco resultó ser modificada *in vitro* (Alegret y col., 1991). Sin embargo, la correlación entre la actividad NADPH citocromo c reductasa y la β -oxidación peroxisómica ($y=3.297(\pm 0.429)x + 161.449(\pm 9.334)$; $r^2=0.286$; $p=0.0001$; $n=149$), indica, como máximo, una contribución del 30 % de la β -oxidación peroxisómica al incremento en la actividad NADPH citocromo c reductasa.

El efecto de los fibratos sobre esta actividad enzimática probablemente está relacionado con la capacidad de dichos fármacos para inducir la expresión de los genes que codifican el citocromo P450IVA1. Esta hipótesis parece plausible ya que se ha demostrado que ciertos fármacos capaces de inducir la expresión de determinados citocromos de la familia P450, como el fenobarbital, son también capaces de inducir la NADPH citocromo c reductasa (Waxman y Azaroff, 1992). Dado que tanto fenobarbital como los fibratos actúan por un mismo mecanismo de activación transcripcional de los genes (Bell y col., 1992), es posible que la inducción de ambos genes (citocromo P450IVA1 y NADPH citocromo c reductasa) esté relacionada de igual manera. La capacidad de inducir el citocromo P450IVA1 es una característica típica de los proliferadores peroxisómicos (Moody y col., 1992). Esta relación indirecta entre el incremento de la reductasa y la β -oxidación peroxisómica, a través de la inducción del citocromo P450IVA1, explicaría el bajo coeficiente de correlación obtenido para ambas actividades enzimáticas. Asimismo, la refractariedad de otras especies animales, como los cobayas, a la inducción del citocromo P450IVA1 (Moody y col., 1992), se relaciona con la falta de efecto de los fibratos sobre la NADPH citocromo c reductasa en esta especie.

Como resumen de los resultados presentados en este trabajo, las siguientes tablas muestran los efectos de CFB, BFB y GFB sobre las actividades enzimáticas y los parámetros no enzimáticos estudiados en rata, así como la acción del GFB en el caso de los cobayas. Asimismo, se indican los casos en que la modificación producida en rata depende en un porcentaje

considerable del fenómeno de la proliferación peroxisómica. Para ello se han considerado únicamente aquellas correlaciones con un valor de r^2 superior a 0.4. En el caso de la NADPH citocromo c reductasa, aunque el coeficiente de correlación es más bajo, se considera que sí existe una relación con la inducción peroxisómica, por las razones expuestas anteriormente.

PARAMETROS NO ENZIMATICOS

Fármaco	RATA			RELACION	COBAYA
	CFB	BFB	GFB	β -OXID.	GFB
Peso corporal	↓	↓	↓	NO	=
Consumo dieta	=	↑	↑	NO	n.d.
Hepatomegalia	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.659;0.654)	=
Colesterol	↓↓	↓↓	↓	NO	n.d.
Triglicéridos	↓	↓↓	↓↓	NO	n.d.

Parámetros no enzimáticos ↑: incremento, ↓: disminución, =: sin modificación, n.d: no determinado. Entre paréntesis se muestran los coeficientes de correlación mayores de 0.4.

De los parámetros no enzimáticos estudiados, únicamente la hepatomegalia depende mayoritariamente del fenómeno de la inducción peroxisómica. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que no se ha descrito la presencia de hepatomegalia tras tratamiento crónico con fibratos en humanos (Monk y Todd, 1987; Todd y Ward, 1988). Respecto a los efectos observados sobre la evolución ponderal y el consumo de alimento, aunque son fenómenos independientes de la β -oxidación, no se reproducen en cobaya. Tampoco parecen producirse en el hombre, o, por lo menos, la pérdida de peso y la hiperfagia no figuran como efectos secundarios reconocidos de los fibratos (Monk y Todd, 1987; Todd y Ward, 1988). Sin embargo, sería problemático evidenciar un efecto de este tipo en humanos, dado que es muy difícil el control de estos factores, máxime teniendo en cuenta que el tratamiento con fibratos se introduce después de someter al paciente a un control dietético que

suele modificar en gran medida su peso corporal.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, los efectos sobre los lípidos plasmáticos no dependen de la proliferación peroxisómica, dado que la administración clínica de fibratos produce un efecto hipolipemiante en humanos sin que exista inducción de este orgánulo.

PARAMETROS ENZIMATICOS

Fármaco	RATA			RELACION	COBAYA
	CFB	BFB	GFB	β-OXID.	GFB
NADH cb ₅ RD	=	=	=		n.d.
NADH CC RD	↓↓	↓↓	↓	NO	↓ (n.s)
NADPH CCRD	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.286)	=
PCH Ms	↑	↑↑↑	↑↑	NO	=
PCH Cit	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.473)	=
PCH MP	=	=	=		n.d
PCH ML	=	=	=		n.d.
PCS	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.535)	=
Elong. 16:0	↑	↑↑	↑	NO	↑
Elong. 16:1	=	=	↑	NO	↑
Elong. 18:3	=	=	=		↑
Delta-9 desat.	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.445)	=
Delta-5 desat.	↑↑	↑↑↑	↑	SI (0.425)	n.d
Delta-6 desat.	↑↑	↑↑	↑↑↑	NO	n.d.

Parámetros enzimáticos ↑: incremento, ↓: disminución, =: sin modificación, n.d.: no determinado. Entre paréntesis se muestran los coeficientes de correlación mayores de 0.4. Abreviaciones: Cb₅Rd: citocromo b₅ reductasa; CC Rd: citocromo c reductasa; PCH: palmitoil-CoA hidrolasa; Ms: microsomas; cit:citosol; MP: mitocondrias pesadas; ML: mitocondrias ligeras; elong: elongación; desat: desaturación.

Respecto a las actividades enzimáticas estudiadas, las modificaciones inducidas por la administración de fibratos parece existir una dependencia clara de la proliferación peroxisómica en el caso de la palmitoil-CoA hidrolasa citosólica, la palmitoil-CoA sintetasa, la delta-9 y delta-5 desaturasas, y, aunque de forma indirecta, en el de la NADPH citocromo c reductasa. Dado el alto porcentaje de contribución de la proliferación peroxisómica a la modificación de estas actividades enzimáticas, ninguna de ellas debería producirse, al menos con la misma intensidad, en humanos. Confirma esta hipótesis el hecho de que tras la administración de GFB a cobayas, no se registró ninguna variación en dichas actividades enzimáticas.

Por otra parte, la disminución de la actividad NADH citocromo c reductasa, así como los incrementos en las actividades palmitoil-CoA hidrolasa microsomal, delta-6 desaturasa, y elongación de substratos saturados (y monoinsaturados en el caso del GFB), al ser mayoritariamente independientes de la proliferación peroxisómica, pueden producirse también en especies refractarias a la inducción peroxisómica, como sucede en cobayas en la mayoría de dichas actividades enzimáticas. Aunque la extrapolación a humanos de datos obtenidos en animales de experimentación siempre es arriesgada, podríamos decir que las modificaciones detectadas en estas actividades enzimáticas podrían, al menos en teoría, tener lugar tras el tratamiento de humanos con estos fibratos. De ellas, las que mayor repercusión podrían tener sobre el metabolismo lipídico son las modificaciones en la elongación de ácidos grasos, particularmente saturados, y en la delta-6 desaturación de ácidos grasos poliinsaturados. Por ello, resultaría de gran interés estudiar si estas modificaciones enzimáticas se reflejan en cambios en la composición cuali y cuantitativa de los ácidos grasos presentes, no solo en las membranas celulares, sino también en las lipoproteínas plasmáticas.

CONCLUSIONES

PARAMETROS NO ENZIMATICOS

1. La administración de clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo a ratas Sprague-Dawley macho produce una marcada hepatomegalia que se correlaciona directamente con el incremento registrado en la actividad β -oxidación peroxisómica. El orden de potencia para estos efectos ha sido BFB>CFB>GFB. En cambio, no se ha evidenciado incremento del peso relativo del hígado ni de la actividad β -oxidación peroxisómica en cobaya, especie resistente a la inducción peroxisómica.

2. Los fibratos producen *in vitro* una inhibición de la actividad β -oxidación peroxisómica tanto en rata como en cobaya. El hecho de que, sin embargo, la inducción de esta actividad enzimática *in vivo* sólo se manifiesta en rata indica que la proliferación peroxisómica no constituye una respuesta adaptativa del organismo a la inhibición de este sistema enzimático.

3. La administración de fibratos produce en las ratas tratadas una tendencia hacia un menor incremento ponderal. Este hecho, que no se reproduce en cobayas tras el tratamiento con gemfibrozilo durante 15 días, contrasta con el incremento en el consumo de alimento detectado en ratas tratadas con bezafibrato y gemfibrozilo. Ninguno de estos efectos parece depender mayoritariamente del fenómeno de la proliferación peroxisómica.

PARAMETROS PLASMATICOS

1. El tratamiento de ratas normolipidémicas con clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo produce importantes reducciones en los niveles de lípidos plasmáticos (colesterol y triglicéridos), con un patrón de potencia hipolipidémica similar al descrito para su utilización clínica.

2. El efecto hipolipemiante parece ser mayoritariamente independiente de la proliferación peroxisómica. Las correlaciones inversas halladas con la

actividad β -oxidación peroxisómica, aunque débiles, podrían reflejar un efecto coadyuvante, no un requerimiento absoluto, del fenómeno de inducción peroxisómica a la disminución de los niveles plasmáticos de lípidos.

PARAMETROS ENZIMATICOS

1. El tratamiento de ratas con fibratos, a pesar de inducir proliferación peroxisómica, no modifica el patrón de distribución subcelular en el hígado.

Palmitoil-CoA hidrolasas

1. El tratamiento de ratas con clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo produce un incremento en la actividad palmitoil-CoA hidrolasa de localización microsomal y, en mayor grado, de la citosólica. En cambio, ni la actividad palmitoil-CoA hidrolasa de mitocondrias pesadas ni la de mitocondrias ligeras resultaron apreciablemente modificadas. Asimismo, ninguna de las actividades hidrolasa ensayadas fueron modificadas por la administración de gemfibrozilo a cobayas.

2. Parece existir un fuerte dependencia entre el incremento en la actividad palmitoil-CoA hidrolasa citosólica y la proliferación peroxisómica, corroborada por la ausencia de variación en esta actividad enzimática en cobayas tratados. El incremento en la actividad hidrolasa citosólica en rata no es atribuible a la existencia de una respuesta compensatoria del organismo a la inhibición *in vitro*.

3. La evolución temporal de los incrementos en las actividades palmitoil-CoA hidrolasa citosólica y microsomal concuerdan con la hipótesis de que al menos parte de la inducción del enzima citosólico se debe a la ruptura de peroxisomas producida por el tratamiento con fibratos.

4. El efecto inhibitorio *in vitro* de los fármacos sobre la palmitoil-CoA

hidrolasa citosólica parece limitarse a la actividad constitutiva del citosol de rata. La actividad inducida por el tratamiento con fibratos (mayoritariamente hidrolasa I) es distinta a la constitutiva y no resulta inhibida *in vitro*.

Palmitoil-CoA sintetasa

1. El incremento en la actividad palmitoil-CoA sintetasa está directamente relacionado con la proliferación peroxisómica. Sin embargo, la correlación hallada con la palmitoil-CoA hidrolasa citosólica está de acuerdo con la hipótesis de que el incremento en la actividad de la sintetasa se produce por un fenómeno de sobrecarga de sustrato.

Sistemas de elongación microsomal

1. La administración de clofibrato, bezafibrato y gemfibrozilo a ratas produce efectos distintos según el sustrato utilizado: los tres fármacos producen tras su administración un marcado incremento en la actividad de elongación microsomal hepática de ácidos grasos saturados; respecto a la elongación de sustratos monoinsaturados, únicamente el tratamiento con gemfibrozil ha producido el incremento en esta actividad enzimática; por último, ninguno de los tres fármacos resultó modificar la actividad de elongación de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, la actividad de elongación microsomal hepática en cobaya tras el tratamiento con gemfibrozil resulta incrementada sea cual sea el sustrato utilizado.

2. Los resultados obtenidos están de acuerdo con la existencia de tres sistemas de elongación microsomal distintos, uno para ácidos grasos saturados, otro para sustratos monoinsaturados, y un tercero activo para ácidos grasos poliinsaturados.

3. De forma genérica, puede afirmarse que el incremento en las

actividades de elongación tras la administración de fibratos es prácticamente independiente del fenómeno de la inducción peroxisómica. El fenómeno podría atribuirse a una respuesta compensatoria del organismo a la inhibición producida *in situ*.

Sistemas de desaturación microsomal

1. Los tres sistemas de desaturación microsomal estudiados (delta-9, delta-5 y delta-6 desaturasa) resultan incrementados en hígado de rata tras la administración de clofibrato bezafibrato y gemfibrozilo.

2. Los incrementos en la actividad delta-9 y delta-5 desaturasa parecen responder principalmente al fenómeno de la proliferación peroxisómica. En el caso de la delta-9 desaturasa, esta hipótesis se refuerza por la ausencia de efecto del tratamiento con gemfibrozilo sobre dicha actividad enzimática en cobaya.

3. En cambio, el aumento en la actividad delta-6 desaturasa parece ser independiente de la inducción peroxisómica, siendo más bien atribuible a una compensación a la inhibición producida *in situ* en el organismo vivo.

Cadenas de transporte electrónico microsomal

1. De las tres actividades enzimáticas valoradas, únicamente la NADH citocromo b₅ reductasa no ha resultado modificada por la administración de fibratos a ratas. En cambio, se registró una disminución en la actividad NADH citocromo c reductasa y un incremento en la NADPH citocromo c reductasa en rata. En cobaya, ninguna de estas actividades resultó modificada significativamente.

2. La disminución en la actividad NADH citocromo c reductasa parece ser independiente de la inducción peroxisómica que se produce en ratas.

3. Parece existir una relación entre el incremento de la NADPH citocromo c reductasa y la β -oxidación peroxisómica, aunque de manera indirecta, a través de la inducción del citocromo P450IVA1.

BIBLIOGRAFIA

- Aarsland A., Berge R.K.
Peroxisome proliferating sulphur- and oxy-substituted fatty acid analogues are activated to acyl-CoA thioesters.
Biochem. Pharmacol. 41, 53-61 (1991).
- Abshagen U., Bablok W., Koch K., Lang P.D., Schmidt H.A.E., Seen M., Stork H.
Disposition pharmacokinetics of bezafibrate in man.
Eur. J. Clin. Phar., 16(1), 31-38 (1979).
- Actis Dato S.M., Catala A., Brenner R.R.
Circadian rhythm of fatty acid desaturation in mouse liver.
Lipids, 8, 1, 1-6 (1972).
- Agustin J., Gnasso A.
Effect of gemfibrozil on lipids, apoproteins and post-heparin lipolytic activities in normolipidemic subjects.
En: Today's therapeutic trends, pp 23-29. Bicker y col. eds. Communications media for education Inc New Jersey (1985).
- Al-Arif A., Blecher M.
Synthesis of fatty acyl-CoA and other thiol esters using N-hydroxysuccinimide esters of fatty acids.
J. Lipid Res. 10, 344-345 (1969).
- Alberts A.W., Vagelos P.R.
Acyl-CoA carboxylases
The Enzymes 6, 53-83 (1972).
- Alegret M., Sánchez R., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.
In vitro effect of clofibric acid derivatives on rat hepatic microsomal electron transport chains.
Biochem. Pharmacol. 18, 2057-2060 (1991).
- Alvares K., Carrillo A., Yuan P.M., Kawano H., Morimoto R.I., Reddy J.K.
Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP 70 family.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5293-5297 (1990).
- Alvarez-Sala L.A., Mata P., Garrido J.A., De Oye M.
Tratamiento farmacológico de las hiperlipoproteinemias.
Inf. Ter. Sist. Nac. Salud 14, 317-329 (1990).
- Baumgart E., Völk, A., Pill J., Fahimi H.D.

Proliferation of peroxisomes without simultaneous induction of the peroxisomal fatty acid β -oxidation.

FEBS Lett. 264, 1, 5-9 (1990).

Bell, D.R., Elcombe C.R.

Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450IVA1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators.

Biochem. J. 280, 249-253 (1991).

Bell D.R., Bars R.G., Elcombe C.R.

Differential tissue-specific expression and induction of cytochrome P450IVA1 and acyl-CoA oxidase.

Eur. J. Biochem. 206, 979-986 (1992).

Bennet A.M., Williams G.M.

Reduction of rat liver endoplasmic reticulum Ca_{2+} ATPase activity and mobilization of hepatic intracellular calcium by ciprofibrate, a peroxisome proliferator.

Biochem. Pharmacol. 43, 3, 595-605 (1992).

Berge R.K.

Purification and characterization of a long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver microsomes.

Biochim. Biophys. Acta, 574, 321-333 (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., Bakke O.M.

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

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

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., Flatmark T., Osmundsen H.

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

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

Berge R.K., Aarsland A.

Correlation between the cellular level of long-chain acyl-CoA, peroxisomal β -

oxidation and palmitoyl-CoA hydrolase activity in rat liver. Are two enzyme systems regulated by a substrate-induced mechanism?
Biochem. Biophys. Acta, 837, 141-151 (1985).

Berge R.K., Stensland E., Aarsland A., Tsegai G., Osmundsen H., Aarsaether N., Gjellesvik G.R.
Induction of clofibroyl-CoA hydrolase activity in livers of rat treated with clofibrate.
Biochim. Biophys. Acta 918, 60-66 (1987).

Berndt J., Gaumert., 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).

Bernert J.T. Jr., Sprecher H.
An analysis of partial reactions in the overall chain elongation of saturated and unsaturated fatty acids by rat liver microsomes.
J. Biol. Chem. 252, 6736-6744 (1977).

Bernert J.T. Jr., Sprecher H.
The effect of bovine serum albumin on partial reactions of palmitoyl-CoA chain elongation by rat liver microsomes.
Biochim. Biophys. Acta 531, 44-55 (1978).

Bieri F., Lhuguenot J.C.
Toxicity of peroxisome proliferators.
Biochimie 75, 263-268 (1993).

Bihain B.E., Deckelbaum R.I., Yen F.T., Gleeson A.M., Carpentier Y.A., Witte L.D.
Unesterified fatty acids inhibit the binding of low density lipoproteins to the human fibroblast low density lipoprotein receptor.
J. Biol. Chem. 264, 17316, 17321 (1989).

Boie Y., Adam M., Rushmore T.H., Kennedy B.P.
Enantioselective activation of the peroxisome proliferator activated receptor.
J. Biol. Chem., 268, 8, 5530-5534 (1993).

Borges T., Glauert H.P., Chen L., Chow Ch., Robertson L.W.
Effect of the peroxisome proliferator perfluorodecanoic acid on growth and lipid metabolism in Sprague-Dawley rats fed three dietary levels of selenium.
Arch. Toxicol. 64, 26-30 (1990).

Bradford M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).

Brady P.S., Marine K.A., Brady L.J., Ramsay R.R.
Coordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyltransferase synthesis by diet and drugs.
Biochem. J. 260, 93-100 (1989).

Brenner R.R.
Metabolism of endogenous substrates by microsomes
Drug Metabol. Rev. 6 (2), 155-212 (1977).

Brenner R.R.
Endocrine control of fatty acid desaturation.
Biochem. Soc. Transac. 18, 773-775 (1990).

Bronfman M., Amigo L., Morales M.N.
Activation of hypolipidaemic drugs to acyl-CoA thioesters.
Biochem. J. 239, 781-784 (1986).

Brown M.S., Kovanen P.T., Goldstein J.L.
Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors.
Science 212, 628-635 (1981).

Cannon J.R., Eacho P.I.
Interaction of LY171883 and other peroxisome proliferators with fatty-acid-binding protein isolated from rat liver.
Biochem J., 280, 387-391 (1991).

Carmena R., Ros E., Gómez-Gerique J.A., Masana L., Ascaso J.F.
Recomendaciones para la prevención de la arteriosclerosis en España.
Clin. Invest. Arteriosclerosis 1, 1-9 (1989).

Cayen M.N., Kranil M., Fernandini E.S., Greselin E., Dvornik D.
The metabolic disposition of etodolac in rats, dogs and man.
Drug Metabol. Rev. 12, 339-362 (1981).

Cayen M.N.
Disposition, metabolism and pharmacokinetics of antyhiperlypidemic agents in laboratory animals and man.
Pharmac. Ter. 29, 157-204 (1985).

Cinti D.L., Cook L., Nagi M.N., Suneja S.K.
The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum.
Prog. Lipid Res. 31, 1-51 (1992).

Cleary M.P.
Effect of dehydroepiandrosterone treatment on liver metabolism in rats.
Int. J. Biochem. 22, 205-210 (1990).

Cook H. W.

Fatty Acid desaturation and chain elongation in eucaryotes.
In *Biochemistry of lipid acid membranes*. Chapter 6, pp 181-212. Vance D. E.,
Vance J. E. eds. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. California
(1985).

Cook L., Prasad M.R., Vieth R., Cinti D.L.

Hepatic microsomal short-chain β -hydroxyacyl-CoA dehydrase distinct from
the fatty acid elongation component substrate specificity of the membrane-
extracted enzyme.

Arch. Biochem. Biophys. 236, 26-35 (1985).

Crane D.I., Zamattia J., Masters C.J.

Alterations in the integrity of peroxisomal membranes in livers of mice
treated with peroxisome proliferators.

Mol. and Cel. Biochem. 96, 153-161 (1990).

Chinje E., Gibson G.G.

Stereochemical selectivity in the induction of cytochrome P450IVA1 (P452)-
dependent fatty acid hydroxylation and peroxisome proliferation.

Biochem. Pharmacol. 41, 5, 769-774 (1991).

Christiansen R.J., Osdmundsen H., Borrebaek B., Bremen J.

The effects of clofibrate feeding on the metabolism of palmitate and erucate
in isolated hepatocytes.

Lipids 137, 487-491 (1978).

Christiansen E.N., Lund J.S., Rortveit T., Rustan A.C.

Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver.

Biochim. Biophys. Acta 1082, 57-62 (1991).

Christie W.W.

De: *Advances in Lipid Methodology*. Cap. 6: Silver ions chromatography and
lipids, pps 129-160. Bell and Bain eds. The Oily Press Ltd, Scotland (1992).

Dailey H.A., Strittmatter P.

Characterization of the interaction of amphipatic cytochrome b_5 with stearyl-
Coenzyme A desaturase and NADPH:cytochrome P-450 reductase.

J. Biol. Chem. 255, 5184-5189 (1980).

Davis J.W., van den Heuvel J.P., Peterson R.E.

Effects of perfluorodecanoic acid on de novo fatty acid and cholesterol
synthesis in the rat.

Lipids 26, 857-859 (1991).

De Duve C., Baudhuin P.

Peroxisomes (microbodies and related particles).

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

Debry G., Pelletier X.
Physiological importance of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids in man. An overview of still unresolved controversial questions.
Experientia 47, 172-178 (1991).

Demirkapi N., Carreu J-P., Chesquier D.
Evidence against cytochrome b₅ involvement in liver microsomal fatty acid elongation.
Biochim. Biophys. Acta 1082, 49-56 (1991).

Desreumaux C., Dedonder E., Dewailly P., Sezille G. Fruchart J.C.
Effects of unsaturated fatty acids in phospholipids on the in vitro activation of the lipoprotein lipase and the triglyceride lipase.
Arzneim. Forsch/Drug Res. 29, 1581-1583 (1979).

Driven H.A.A.M., van der Broeck P.H.H., Peeters M.C.E., Peters J.G.P., Mennes W.C., Blaauboer B.J., Noordhoeck J., Jongeneelen F.J.
Effects of the peroxisome proliferator mono(2-ethylhexyl)phthalate in primary hepatocyte cultures derived from rat, guinea-pig, rabbit and monkey. Relationship between interspecies differences in biotransformation and biotransformation and peroxisome proliferating potencies.
Biochem. Pharmacol. 45, 2425-2434 (1993).

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.
En: *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).

Eacho P.I., Lanier T.L., Foxworthy P.S., Hoover D.M.
Effect of the peroxisome proliferator LY171883 on hepatocellular replication in female B6C3F1 mice.
Fund. and Appl. Toxicol. 18, 632-634 (1992).

Earl D.C.N, Korner A.
The isolation and properties of cardiac ribosomes and polysomes.
Biochem J. 94, 721-734 (1965).

Eisenberg S.
En: *Treatment of severe hypercholesterolemia in the prevention of coronary heart disease*. 2. Gotto A.M.Jr., Mancini M., Richeter W.O., Schwandt P.

(eds). Proc. 2nd Int. Symp., Munich (1989). Basel Karger 56-65 (1990).

Ellman G.L.

Tissue sulphydril groups.

Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77 (1959).

Endo A.

Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors.
Klin. Wochenschr. 66, 421-427 (1986).

Esbenshade T.A., Kamanna V.S., Newman H.A.I., Tortorella V., Witiak D.T.,
Feller D.R.

In vivo and in vitro peroxisome proliferation properties of selected clofibrate
analogues in the rat.

Biochem. Pharmacol. 40, 1263-1274 (1990).

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 H.D., Baumgart E., Völkl A.

Ultrastructural aspects of the biogenesis of peroxisomes in rat liver.

Biochimie 75, 201-208 (1993).

Fong J.C., Schulz H.

Short-chain and long-chain enoyl-CoA hydratases from pig heart muscle.

Methods Enzymol. 71, 390-398 (1981).

Fredrickson D.S., Lees R.S.

A sistem for phenotyping hiperlipoproteinemia.

Circulation 31, 321-327 (1965).

Garg M.L., Wierzbicki A.A., Thomson A.B.R., Clandinin M.T.

Dietary cholesterol and/or n-3 fatty acid modulate delta-9 desaturase activity
in rat liver microsomes.

Biochim. Biophys. Acta 960, 19-25 (1988).

Gatt S., Bartfai T.

Rate equations and simulation curves for enzymatic reactions which utilize
lipids as substrates II. Effect of adsorbtion of the sustrate or enzyme on the
steady-state kinetics.

Biochim. Biophys. Acta 488, 13-24 (1977).

Gebel T., Arand M., Oesch F.

Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in
rat liver.

FEBS Lett. 309, 1, 37-40 (1992).

Glatz J.F.C., van der Vusse G.J.
Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions.
Mol. Cel. Biochem. 98, 237-251 (1990).

Glock G.E., McLean P.
Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-fosfoglucanate dehydrogenase of rat liver.
Biochem. J. 55, 400-408 (1953).

Gomez Gerique J.A.
Lipoproteínas plasmáticas.
Boehringer Mannheim S.A. Barcelona (1991).

Green D.E., Mii S, Kohout P.M.
Studies on the terminal electron transport system. I: Succinic deshidrogenase.
J. Biol. Chem. 217, 551-567 (1955).

Gugler R., Hartlapp J.
Clofibrate kinetics after single and multiple doses.
Clin. Pharmac. Ther. 24, 432-438 (1978).

Gugler R., Shoemann D.W., Huffman D.H., Cohlma J.B., Azarnoff D.L.
Pharmacokinetics of drugs in patients with the nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. 55, 1182-1189 (1975).

Hardeman D.
Peroxisomes and their involvement in the biosynthesis of ether phospholipids.
Teis Doctoral, Rijkuniversiteit Utrecht (Holanda), 1990

Hardie D.G.
Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxilase.
Prog. Lipid Res. 28, 117-146 (1989).

Harrison E.H.
Action of clofibrate and its analogs in rat. Dissociation of hypolipidemic effects and the induction of peroxisomal β -oxidation.
Biochim. Biophys. Acta 796, 163-168 (1984).

Hawkins J.M., Jones W.E., Bonner F.W., Gibson G.G.
The effect of perioxosome proliferators on microsomal, perioxosomal and mitochondrial enzyme activities in the liver and Kidney.
Drug Metabol. Rev. 18, 441-515 (1987).

Hayashi H., Takahata S.
Role of peroxisomal fatty acyl-CoA β -oxidation in phospholipid biosynthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 284, 326-331 (1991).

- Herrera E., Lasunción M.A., Castro M., Gómez Coronado D., Martín A., Quack G.
Studies with etofibrate in the rat. Part I: effects on glycerol, free fatty acid and triacylglycerol metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 963, 42-52 (1988).
- Hiltunen J.K.
Peroxisomes and β -oxidation of long-chain unsaturated carboxylic acids.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 51, Suppl. 204, 33-46 (1991).
- Hinsch W., Klages C., Seubert W.
On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty acid synthesis. Different properties of mitochondrial chain elongation and enoyl-CoA reductase in various tissues.
Eur. J. Biochem. 64, 45-55 (1976).
- Horie S., Suzuki T., Suga T.
Existence of acetyl-CoA dependent chain elongation system in hepatic peroxisomes of rat. Effects of clofibrate and di-(2-ethylhexyl)phtalate on the activity.
Arch. Biochem. Biophys. 274, 64-73 (1989).
- Houin G., Thebault J.J., D'Athis P., Trillement J.P., Beaumont J.L.
A GLC method for estimation on 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) oxido reductase. Direct electron input to the microsomal fatty acid chain elongation system.
J. Biol. Chem. 256, 10066-10072 (1981).
- Illingworth D.R.
Lipid-lowering drugs. An overview of indications and optimum therapeutic use.
Drugs 33, 259-279 (1987).
- Illingwoth D.R.
Management of hyperlipidemia: goals for the prevention of atherosclerosis.
Clin. Invest. Med. 13, 211-218 (1990).
- Issemann I., Green S.

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.

Nature 347, 645-649 (1990).

Itoga H., Tamura H., Watanabe T., Suga T.

Characteristics of the suppressive effect of nicardipine on peroxisome induction in rat liver.

Biochim. Biophys. Acta 1051, 21-28 (1990).

Jeffcoat R.

The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver.

En: Essays in Biochemistry, pp 1-36. Campbell P. N., Marshall R. D. eds. The Biochemical Society by Academic Press. London, New York, San Francisco (1979).

Johnson W.J., Mahlberg F.H., Rothblat G.H., Philips M.C.

Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins

Biochim. Biophys. Acta 1085, 273-298 (1991).

Kaikaus R.M., Chan W.R., Lysenko N., Ray R., Ortiz de Montellano P.R., Bass N.M.

Induction of peroxisomal fatty acid β -oxidation and liver fatty acid-binding protein by peroxisome proliferators. Mediation via the cytochrome P-450IVA1 ω -hydroxylase pathway.

J. Biol. Chem. 268, 9593-9603 (1993).

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., Suzuki Y., Hashimoto Y.

Dietary control of chain elongation of palmitoyl-CoA in rat liver microsomes.

Lipids 12, 5, 434-437 (1977).

Kawashima Y., Kozuka H.

Increased activity of stearoil-CoA desaturation in liver from rat fed clofibric acid.

Biochim. Biophys. Acta 713, 662-628 (1982).

Kawashima Y., Katoh H., Kozuka H.

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

Biochim. Biophys. Acta 750, 365-372 (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 (1984).

Kawashima Y., Hiroshi K.
Regulation of palmitoyl-CoA elongation and linoleoil-CoA chain elongation in
rat liver microsomes and the differential effects of peroxisome proliferators,
insulin and thyroid hormone.
Biochim. Biophys. Acta 834, 118-123 (1985).

Kawashima Y., Hirose A., Kozuka H.
Alterations by peroxisome proliferators of acyl composition of hepatic
phosphatidylcholine in rats, mice and guinea-pigs.
Biochem. J. 235, 251-255 (1986).

Kawashima Y., Uy-Yu N., Kozuka H.
Sex-related difference in the enhancing effects of perfluoro-octanoic acid on
stearoyl-CoA desaturase and its influence on the acyl composition of
phospholipid in rat liver. Comparison with clofibric acid and tiadenol.
Biochem. J. 263, 897-904 (1989a).

Kawashima Y., Uy-Yu N., Kozuka H.
Sex-related difference in the inductions by perfluoro-octanoic acid of
peroxisomal β -oxidation, microsomal 1-acyl-glycerophosphocoline
acyltransferase and cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver.
Biochem. J. 261, 595-600 (1989b).

Kawashima Y., Keiichi M., Kozuka H.
Peroxisome proliferators enhance linoleic acid metabolism in rat liver.
Increased biosynthesis of omega-6 polyunsaturated fatty acids.
J. Biol. Chem. 265, 9170-9175 (1990).

Keller H., Dreyer C., Medin J., Mahfoudi A., Ozato K., Wahli W.
Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of
peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2160-2164 (1993).

Kesaniemi Y.A., Grundy S.M.
Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and
plasma triglycerides in man.
JAMA 251, 2241-2247 (1984).

Keyes S.R., Alfano J.A., Jansson I., Cinti D.L.
Rat liver microsomal elongation of fatty acids. Possible involvement of
cytochrome b_5 .
J. Biol. Chem. 254, 7778-7784 (1979).

Kiss Z.

Effects of phorbol ester on phospholipid metabolism.
Prog. Lipid Res. 29, 141-166 (1990).

Knudsen J.

Acyl-CoA binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid binding protein (FABP): an overview.
Mol. and Cell. Biochem. 98, 217-223 (1990).

Knudsen J.

Acyl-CoA binding and transport, an alternative function for diazepam binding inhibitor (DBI), which is identical with acyl-CoA binding protein.
Neuropharmacol. 30, 1405-1410 (1991).

Kozuka H., Yamada J., Horie S., Watanabe T., Suga T., Ikeda T.

Characteristics of induction of peroxisomal fatty acid oxidation-related enzymes in rat liver by drugs. Relationships between structure and inducing activity.

Biochem. Pharmacol., 41, 4, 617-623 (1991)

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

Liver growth and early cellular changes in response to peroxisomal 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. Lipid. Res. 26, 940-949 (1985).

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).

Laemmli U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685 (1970).

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

Action of Ebselen on rat hepatic microsomal enzyme-catalyzed fatty acid chain elongation, desaturation and drug biotransformation.

Arch. Biochem. Biophys, 269, 272-283 (1989).

Lagrost L., Barter P.J.

Effects of various non-esterified fatty acids on the particle size redistribution of high density lipoproteins induced by the human cholesteryl ester transfer

protein .

Biochim. Biophys. Acta 1082, 204-210 (1991).

Lake B.G., Gray T.J.B.

Species differences in hepatic peroxisome proliferation.

Biochem. Soc. Trans. 13, 859-861 (1985).

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.

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

Lalwani N.D., Alvares K., Reddy M.K., Reddy M.N., Parikh I, Reddy J.K.

Peroxisome proliferator-binding protein: identification and partial characterization of nafenopin-, clofibric acid-, and ciprofibrate-binding protein from rat liver.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5242-5246 (1987).

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).

Landiscrina C., Ruggiero F.M., Gnoni G.V., Quagliariello E.

Reduced activity of hepatic microsomal fatty acid chain elongation synthesis in clofibrate-fed rats.

Biochem. Pharmacol. 26, 1401-1404 (1977).

Latruffe N.

Les peroxysomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organe méconnu.

Synthèse m/s 3, 239-248 (1992).

Lazarow P.B.

Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids.

Methods Enzymol. 72, 315-319 (1981).

Lazarow P.B., De Duve C.

A fatty acyl-CoA oxidising system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidaemic drug.

Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2043-2046 (1976).

Lazo M., Comtreras M., Yoshida Y., Singh A.K., Staney W., Weise M., Singh I.

Cellular oxidation of lignoceric acid is regulated by the subcellular localization of lignoceroyl-CoA ligases.

J. Lipid Res. 31, 583-595 (1990).

Leikin A. I., Benner R.R.
Regulation of linoleic acid delta-6 desaturation by a cytosolic lipoprotein-like fraction in isolated rat liver microsomes.
Biochim. Biophys. Acta 876, 300-308 (1986).

Leikin A. I., Benner R.R.
Microsomal delta-5 deaturation of eicosa-8,11,14-trienoic acid is activated by a cytosolic fraction.
Lipids 24, 101-104 (1989).

Lewis D.F.V., Lake B.G.
Interaction of some peroxisome proliferators with the mouse liver peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): a molecular modelling and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study.
Xenobiotica 23, 79-96 (1993).

Ludwig S.A., Sprecher H.
Substrate specificity studies on the malonyl-CoA dependent chain elongation of all-cis polyunsaturated fatty acids by rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 197, 333-341 (1979).

Mahfouz M.M., Kummerow F.A.
Effect of magnesium defficiency on delta-6 desaturase activity and fatty acid composition of rat liver microsomes.
Lipids 24, 727-732 (1989).

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

Mannaerts G.P., Cebear 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).

Marra C.A., de Alaniz M.J.T., Brenner R.R.
Modulation of delta-6 and delta-5 rat liver microsomal desaturase activities by dexamethasone-induced factor.
Biochim. Biophys. Acta 879, 388-393 (1986).

Marra C.A., de Alaniz M.J.T., Brenner R.R.
A dexamethasone-induced protein stimulates delta-9 desaturase activity in rat liver microsomes.
Biochim. Biophys Acta 958, 93-98 (1988).

Marsman D.S., Goldsworthy T.L., Popp J.A.
Contrasting hepatocytic peroxisome proliferation, lipofucsin accumulation and

cell turnover for the hepatocarcinogens Wy-14, 643 and clofibrilic acid.
Carcinogenesis 13, 1011-1017 (1992).

McGuire E.J., Lucas J.A., Gray R.H., de la Iglesia F.A.
Peroxisome induction potential and lipid-regulating activity in rats.
Quantitative microscopy and chemical structure-activity relationships.
Am. J. Pathol., 139, 217-229 (1991).

McGuire E.J., Gray R.H., de la Iglesia F.A.
Chemical Structure-activity relationships: peroxisome proliferation and lipid
regulation in rats.
J. Am. Coll. Toxicol., 11, 353-361 (1992).

McIntosh M.K., Berdanier C.D.
Antiobesity effects of dehydroepiandrosterone are mediated by futile substrate
cycling in hepatocytes of BHE/cdb rats.
J. Nutr. 121, 2037-2043 (1991).

Mead J.F., Alfin-Slater R.B., Howton D.R., Popják G.
Biosynthesis of fatty acids.
En: *Lipids, Chemistry, Biochemistry and Nutrition*. Cap. 8, pp 114-131.
Plenum Press. New York and London. (1986a).

Mead J.F., Alfin-Slater R.B., Howton D.R., Popják G.P.
Desaturation of fatty acids. The essential fatty acids.
En: *Lipids, Chemistry, Biochemistry and Nutrition*. Cap. 9, pp 133-147.
Plenum Press. New York and London (1986b).

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

Miller N.E.
Raising high density lipoprotein cholesterol. The biochemical pharmacology
of reverse cholesterol transport.
Biochem. Pharmacol., 40, 403-410 (1990).

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., Hishimoto T.
Induction of a novel long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver by
administration of peroxisomal proliferators.
Eur. J. Biochem. 117, 425-430 (1981).

Monfort S., Ramos P., Alonso A., Maroto L., Caso J.

Hiperlipoproteinemias y arteriosclerosis en el paciente geriátrico.
Monografía, Lab. Wassermann, Barcelona (1989).

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.

Serum triglyceride and cholesterol contents in male rats receiving diets containing plasticisers and analogues of the ester 2-ethylhexanol.
Toxicol. Lett. 10, 379-383 (1982).

Moody D.E., Reddy J.K., Lake B.G., Popp J.A., Reese D.H.

Peroxisome proliferation and nongenotoxic carcinogenesis: commentary on a symposium.
Fund. Appl. Toxicol. 16, 233-248 (1991).

Moody D.E., Gibson G.G., Grant D.F., Magdalou J., Rao M.S.

Peroxisome proliferators, a unique set of drug-metabolizing enzyme inducers: commentary on a symposium.
Drug Metabol. Disp. 20, 6, 779-791 (1992).

Moser H.W.

Peroxisomal disorders.
Clin. Biochem., 24, 343-351 (1991).

Murad S., Kishimoto Y.

Chain elongation of fatty acid in brain: a comparison of mitochondrial and microsomal enzyme activities.
Arch. Biochem. Biophys. 185, 300-306 (1978).

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

Do rat hepatic microsomes contain multiple NADPH-supported fatty acid chain elongation pathways or a single pathway?
Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 74-80 (1986).

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

Biochemical properties of short and long chain rat liver microsomal trans-2-enoyl coenzyme A reductase.
Arch. Biochem. Biophys. 226, 50-64 (1983a).

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

Site of participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal fatty acid chain elongation. Electron input in the first reduction step.
J. Biol. Chem. 258, 14823-14828 (1983b).

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

Induction of rat liver mitochondrial fatty acid elongation by the administration of peroxisome proliferator Di-(2-ethylhexyl)phtalate: absence of elongation activity in peroxisomes.

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

Nagi M.N., Cook L., Suneja S.K., Peluso P.S., Laguna J.C., Osei P., Cinti D.L. Evidence for two separate β -keto-acylCoA reductase components of the hepatic microsomal fatty acid chain elongation system in the rat.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1428-1434 (1989a).

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

Disruption of rat hepatic microsomal electron transport chains by the selenium containing antiinflammatory agent Ebselen.

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

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

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

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

Neuringer M., Anderson G.J., Connor W.E.

The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain.

Ann. Rev. Nutr. 8, 517-541 (1988).

Newton R.S.

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

En: Today's Therapeutic Trends, suppl. 1, pp 13-22. Bickers et al eds.

Communications Media for Education Inc. Princeton Junction. New Jersey (1985).

Nisimoto Y., Otsuka-Murakami H.

Cytochrome b_5 , cytochrome c and cytochrome P-450 interactions with NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles.

Biochemistry 27, 5869-5877 (1988).

Okayasu A., Nagao M., Ishibashi T., Imai Y.

Purification and partial characterization of linoleoil-CoA desaturase from rat liver microsomes.

Arch. Biochem. Biophys. 206, 21-28 (1981).

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

The metabolism of gemfibrozil.

Proc. Royal Soc. Med. (Suppl.2), 11-24 (1976).

Ortiz de Montellano P.R., Chan W.K., Tuck S.F., Kaikaus R.M., Bass N.M.,

Peterson J.A.

Mechanism-based probes of the topology and function of fatty acid hydroxylases.

FASEB J. 6, 695-699 (1992).

Osei P., Suneja S.K., Laguna J.C., Nagi M.N., Cook L., Prasad M.R., Cinti D.L.

Topography of rat hepatic microsomal enzymatic components of the fatty acid chain elongation system.

J. Biol. Chem. 264, 6844-6849 (1989).

Oshino N., Imal Y., Sato R.

Electron transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes.

Biochim. Biophys. Acta 128, 13-28 (1966).

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).

Patsch W., Patsch J.R., Gotto A.M., Phil D.

The hyperlipoproteinemias.

Med. Clin. N. Am. 73, 859-893 (1989).

Perry R.S.

Contemporary recommendations for evaluating and treating hyperlipidemia.

Clin. Pharm. 5, 113-127,(1986).

Pill J., Völkl A., Hartig F. Fahimi H.D.

Differences in the response of Sprague_Dawley and Lewis rats to bezafibrate: the hypolipidemic effect and the induction of peroxisomal enzymes.

Arch. Toxicol. 66, 327-333 (1992).

Plane F., Bruckdorfer K.R., Kerr P., Steuer A., Jacobs M.

Oxidative modification of low-density lipoproteins and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta.

Br. J. Pharmacol. 105, 216-222 (1992).

Platt D.S., Cockrill B.L.

Biochemical changes in rat liver in response to treatment with drugs and other agents I. Effects of anticonvulsant antiinflammatory, hypocholesterolaemic and adrenergic beta-blocking agents.

Biochem. Pharmacol. 18, 429-444 (1969).

Podack E.R., Seubert W.

On the mechanism of malonyl-CoA independent fatty acid synthesis. II.

Isolation, properties and subcellular location of trans-2,3-decenoyl-CoA

reductase.

Biochim. Biophys. Acta 280, 235-247 (1972).

Poellinger L. Göttlicher M., Gustaffson J-A.

The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear receptors in search of endogenous ligands.

TIPS, 13, 241-245 (1992).

Poisson J-P. G., Cunnane S.C.

Long-chain fatty acids metabolism in fasting and diabetes: relation between altered desaturase activity and fatty acid composition.

J. Nutr. Biochem. 2, 60-69 (1991).

Pollard A.D., Brindley D.N.

Effect of chronic clofibrate feeding on the activities of enzymes involved in glycerolipid synthesis and in peroxisomal metabolism in rat liver.

Biochem. Pharmacol. 31, 1650-1652 (1982).

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

Kinetic evidence for two separate trans-2-enoyl-CoA reductases in rat hepatic microsomes: NADPH-specific short chain- and NAD(P)H-dependent long-chain reductase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 659-665 (1983).

Prasad M.R., Cinti D.L.

Effect of the peroxisomal proliferator di(2-ethylhexyl)phtalate on component reactions of the rat hepatic microsomal fatty acid chain elongation system and on other hepatic lipogenic enzymes.

Arch. Biochem. Biophys. 248, 479-488 (1986).

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

Evidence for multiple condensing enzymes in rat hepatic microsomes catalyzing the condensation of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated acyl coenzyme A.

J. Biol. Chem., 261, 8213-8217 (1986).

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 from a novel class of chemical carcinogens.

Nature 283, 397-398 (1980).

Reddy J.K., Lalwani N.D.

Carcinogenesis by hepatic proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic

drugs and industrial plasticisers to man.
C.R.C. Crit. Rev. Toxicol. 12, 1-58 (1983).

Reddy J.K., Goel, Nemali M.R., Carrino J.J., Laffler T.G., Reddy M.K., Sperbeck S.J., Osumi T., Hashimoto T., Lalwani N.D., Rao M.S.
Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl_cOA deshydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1747-1751 (1986).

Reubsaet F.A.G., Veerkamp J.H., Bruckwilder M.L.P., Trijbels J.M.F., Monnens L.A.H.
The involvement of fatty acid binding protein in peroxisomal fatty acid oxidation.
FEBS Lett. 267, 229-230 (1990).

Roberts W.C.
Safety of fenofibrate. US and worldwide experience.
Cardiology 76, 169-179 (1989).

Roels F., Espeel M., Poggi F., Mandel H., Van Maldergem L., Saudubray J.M.
Human liver pathology in peroxisomal diseases: a review including novel data.
Biochimie 75, 281-292 (1993).

Rosenthal M.D., Whitehurst M.C.
Selective effects of isomeric cis nad trans fatty acids on fatty acyl delta-9 and delta-6 desaturation by human skin fibroblasts.
Biochim. Biophys. Acta 753, 450-459 (1983).

Sambasiva Rao M., Musunuri S., Reddy J.K.
Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat liver.
Pathobiol. 60, 82-86 (1992).

Sánchez R.M., Alegret M., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.
Differential inhibition of long-chain acyl-CoA hydrolases by hypolipidemic drugs *in vitro*.
Biochem. Pharmacol. 43, 639-644, (1992a).

Sánchez R.M., Viñals M., Alegret M., Vázquez M., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.
Inhibition of rat liver microsomal fatty acid chain elongation by gemfibrozil *in vitro*.
Febbs Lett. 300, 89-92 (1992b).

Sánchez R.M., Vázquez M., Alegret M., Viñals M., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.
Cytosolic lipogenic enzymes: effect of fibric acid derivatives *in vitro*.

Life. Sci. 22, 213-222 (1993a).

Sánchez R.M., Viñals M., Alegret M., Vázquez M., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.

Fibrates modify rat hepatic fatty acid chain elongation and desaturation in vitro.

Biochem. Pharmacol., pendiente de publicación (1993b).

Salam W.H., Wilcox H.G., Cagen L.M., Heimberg M.

Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids. Effects of oleate on cytoplasmatic acetoacetyl-CoA thiolase, acetoacetyl-CoA synthetase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase.

Biochem. J. 258, 563-568 (1989).

Schwandt P.

Fibrates and triglyceride metabolism.

Eur. J. Clin. Pharmacol. 40, 541-543 (1991).

Sgro C., Escousse A.

Effets indésirables des fibrates (hors foie et muscle).

Therapie 46, 351-354 (1991).

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.

Apoprotein A and B (Sf 100-400) metabolism during bezafibrate therapy in hypertriglyceridemic subjects.

J. Clin. Invest. 74, 2164-2177 (1984).

Shepherd J., Griffin B., Caslake M. Gaw A., Packard C.

The influence of fibrates on lipoprotein metabolism.

Atherosclerosis Rev. 22, 163-169 (1991).

Simpson H.S., Williamson C.M., Olivercrona T., Pringle S., McLean J., Lorimer A.R., Bonnefous F., Bogaievsky Y., Packard C.J., Shepherd J.

Postprandrial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease.

Atherosclerosis 85, 193-202 (1990).

Singh H., Poulos A.

Distinct long chain and very long chain fatty acyl-CoA synthetases in rat liver peroxisomes and microsomes.

Arch. Biochem. Biophys. 266, 486-495 (1988).

Sohlenius, A-K., Eriksson A.M., Högström C., Kimland M., DePierre J.W.

Perfluorooctane sulfonic acid is a potent inducer of peroxisomal fatty acid β -

- oxidation and other activities known to be affected by peroxisome proliferators in mouse liver.
Pharmacol. and Toxicol., 72, 90-93 (1993).
- Sprecher H.
Biochemistry of essential fatty acids.
Prog. Lip. Res. 20, 13-22 (1981).
- Staels B., Peinado Onsurbe J., Auwerx J.
Down regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate.
Biocim. Biophys. Acta 1123, 227-230 (1991).
- Stahlberg D., Angelin B., Einarsson K.
Effects of treatment with clofibrate, bezafibrate and ciprofibrate on the metabolism of cholesterol in rat liver microsomes.
J. Lipid Res. 30, 953-957 (1989).
- Stegmeier K., Schdmit 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., Lornier 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).
- Storrie, Madden
Meth. Enzymol. 182, 203-225 (1990).
- Strittmatter P.
Cytochrome b₅.
Meth. Enzymol. 10, 561-565 (1967).
- Strittmatter K., Spatz L., Corcoran D., Rogers M.J., Setlow B., Redline R.
Purification and properties of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4565-4569 (1974).
- Sundseth S.S., Waxman D.J.
Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid w-hydroxylases.
J. Biol. Chem. 267, 6, 3915-3921 (1992).
- Suneja S.K., Osei P., Cook L., Nagi M.N., Cinti D.L.
Enzyme site-specific changes in hepatic microsomal fatty acid chain elongation in streptozotocin-induced diabetic rats.
Biochem. Biophys. Acta 1042, 81-85 (1990).

- 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).
- Tanaka T., Hosaka K., Numa S.
Long-chain acyl-CoA synthetase from rat liver EC 6.2.1.3 Acid:CoA ligase
(AMP forming).
Meth. Enzymol. 71, 334-335 (1981).
- Taylor K.G., Holdsworth G., Galton D.I.
Clofibrate increases LPL activity in adipose tissue of hypertriglyceridemic
patients.
Lancet 2, 1106-1109 (1977).
- Tebbey P.W., Buttke T.M.
Stearoyl-CoA desaturase gene expression in lymphocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 531-536 (1992).
- Thompson S.L., Krisans S.K.
Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis.
J. Biol. Chem, 265, 5731-5735 (1990).
- 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).
- Tomoda H., Igarashi K., Cyding J.C., Omura S.
Evidence for an essential role of long-chain acyl-CoA synthetase in animal cell
proliferation.
J. Biol. Chem. 266, 4214-4219 (1991).
- Tugwood J.D., Issemann I., Anderson R.G., Bundell K.R., McPheat W.L.,
Green S.
The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response
element in the 5' flanking sequence of the rat acyl-CoA oxidase gene.
EMBO J. 11, 433-439 (1992).
- Valle D., Gärtner J.
Penetrating the peroxisome.
Nature 361, 682-683 (1993).

- van den Bosch H., Schutgens R.B.H, Wanders R.J.A., Tager J.M.
 Biochemistry of peroxisomes.
 Ann. Rev. Biochem. 61, 157-197 (1992).
- Vázquez M., Alegret M., Adzet T., Merlos M., Laguna J.C.
 Gemfibrozil modifies acyl composition of liver microsomal phospholipids from guinea-pigs without promoting peroxisomal proliferation.
 Biochem. Pharmacol., pendiente de publicación (1993).
- 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).
- Wakil S.J.
 Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme.
 Biochemistry 28, 4523-4530 (1989).
- Wakil S.J., Stoops J.K., Joshi V.C.
 Fatty acid synthesis and its regulation.
 Ann. Rev. Biochem. 52, 537-579 (1983).
- Waku K.
 Origins and fates of acyl-CoA esters.
 Biochim. Biophys. Acta 1124, 101-111 (1992).
- Watanabe T., Okawa S., Itoga H., Imanaka T., Suga T.
 Involvement of calmodulin- and protein kinase C-related mechanism in an induction process of peroxisomal fatty acid oxidation-related enzymes by hypolipidemic peroxisome proliferators.
 Biochim. Biophys. Acta, 1135, 84-90 (1992).
- Waxman D.J., Azaroff L.
 Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression.
 Biochem. J. 281, 577-592 (1992).
- Wells T.N.C.
 ATP-citrate lyase from rat liver. Characterization of the cytril-enzyme complexes.
 Eur. J. Biochem. 199, 163-168 (1991).
- Yamada J., Sakuma M., Ikeda T., Fukuda K., Suga T.
 Characteristics of dehydroepiandrosterone as peroxisome proliferator.
 Biochem. Biophys. Acta 1092, 233-243 (1991).
- 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).

Yoshida Y., Singh I.

Effect of clofibrate on peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase activity.

Biochem. J. 122, 353-362 (1990).

Yoshida S., Bourre J-M.

Condensation activity for polyunsaturated fatty acids with malonyl-CoA in rat brain microsomes. Characteristics and developmental change.

Biochim. Biophys. Acta, 1123, 316-325 (1992).

(043)93
ALE

