

Departament de Química Orgànica

**FACULTAT DE QUÍMICA**

Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Bienni 2005-2007

**La síndrome de l'oli tòxic: contribució a la seva etiologia mitjançant estudis xenobioquímics sobre el 3-(N-fenilamino)1,2-propandiol**

Memòria presentada per

**Anna Martinez i Cabot**

Per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Director:

Tutor:

Àngel Messeguer i Peypoch

Professor d'Investigació  
Dpt. de Química Orgànica Biològica  
IIQAB-CSIC

Anna Grandas i Sagarra

Catedràtica  
Dpt. de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

## SUMARI GENERAL

Abreviatures	v
<b>1. NOMENCLATURA ABREVIADA ESTABLERTA PER ALS COMPOSTOS DERIVATS DEL PAP</b>	<b>1</b>
1.1. NOMS GENÈRICS DE LES ESTRUCTURES BÀSIQUES	3
1.2. NOMS ESPECÍFICS PER ALS DERIVATS DEL PAP	5
<b>2. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS</b>	<b>7</b>
2.1. LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC	9
2.2. ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE ELS LÍPIDS I ELS DERIVATS DEL PAP	17
2.3. ESTUDI DEL METABOLISME DEL PAP	29
2.4. RELACIÓ ENTRE LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC (SOT) I LA SÍNDROME DE L'EOSINOFÍLIA-MIÀLGIA (SEM)	50
2.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP	55
2.6. OBJECTIUS	65
<b>3. PUBLICACIONS</b>	<b>67</b>
<b>3.1. PUBLICACIÓ I</b>	<b>69</b>
Studies on the toxic oil syndrome: Stereoselective hydrolysis of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol esters by human pancreatic lipase (2004) <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 17, 889-895.	
<b>3.2. PUBLICACIÓ II</b>	<b>83</b>
Synthesis and stability studies of the glutathione and <i>N</i> -acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-( <i>N</i> -phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for toxic oil syndrome (2005) <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 18, 1721-1728.	

<b>3.3. PUBLICACIÓ III</b>	<b>97</b>
<i>In vitro</i> bioactivation of 3-( <i>N</i> -phenylamino)propane-1,2-diol by human and rat liver microsomes and recombinant P450 enzymes. Implications for toxic oil syndrome (2007) <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 20, 1218-1224.	
<b>3.4. PUBLICACIÓ IV</b>	<b>109</b>
Generation of quinoneimine intermediates in the bioactivation of 3-( <i>N</i> -phenylamino) alanine (PAA) by human liver microsomes. A potential link between the eosiniphilia-myalgia syndrome and the toxic oil syndrome (2007) <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 20, 1556-1562.	
<b>3.5. PUBLICACIÓ V</b>	<b>121</b>
Studies on Toxic Oil Sndrome: development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 3-( <i>N</i> -phenylamino)propane-1,2-diol in human urine (enviat a <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> )	
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>155</b>
4.1. HIDRÒLISI ESTEREOSELECTIVA DELS ESTERS DEL PAP PER PART DE LA LIPASA PANCREÀTICA HUMANA	157
4.2. ESTUDIS DE SÍNTESI I ESTABILITAT D'ADDUCTES DE GLUTATIÓ I <i>N</i> -ACETILCISTEÏNA FORMATS AMB L'INTERMEDI IMINOQUINÒNIC GENERAT A PARTIR DE LA BOTRANSFORMACIÓ DEL PAP	163
4.3. ESTUDI DE LA BIOACTIVACIÓ <i>IN VITRO</i> DEL PAP EN PRESENCIA DE MICROSOMES HEPÀTICS HUMANS I DE RATA I DE ISOFORMES RECOMBINANTS DEL CYP450	174
4.4. GENERACIÓ D'INTERMEDIS IMINOQUINÒNICS EN LA BIOACTIVACIÓ DE LA PAA EN PRESENCIA DE MICROSOMES DE FETGE HUMÀ. ESTABLIMENT D'UN POTENCIAL VINCLE DE UNIÓ ENTRE LA SEM I LA SOT	183
4.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP EN ORINA HUMANA	197
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>207</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>213</b>

## ABREVIATURES

Ac	Anticòs
Ag	Antigen
$A_{m\grave{a}x}$	Absorbància màxima
$A_{m\grave{i}n}$	Absorbància mínima
An	Analit
As	Antisèrum
ATP	Adenosina trifosfat
BSA	Albúmina de sèrum boví
BSTFA	<i>O,N</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
CYP450	Citocrom P450
Cys	Cisteïna
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
dPAP	Nom genèric del derivat diacilat del PAP
EBT	1,1-etilidenebis(triptòfan)
ee	Excés enantiomèric
ELISA	Assaig de immunoabsorció lligat a enzims
ESI-HRMS	Ionització per electroesprai-Espectrometria de masses d'alta resolució
FAD	Dinucleòtid de flavina i adenina
FMN	Mononucleòtid de flavina
FDA	Food and drug administration
Gly	Glicina
GSH	Glutatió
GST	Transferases de glutatió
$\gamma$ -GTP	$\gamma$ -Glutamiltanspeptidasa
HCH	Hemocianina de cranc rei
HLM	Microsomes de fetge humà
<i>h</i> LP	Lipasa pancreàtica humana
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HPLC-MS	Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses
HRP	Peroxidasa de rave picant
$IC_{50}$	Concentració d'analit necessària per inhibir l'absorbància d'un assaig immunoenzimàtic competitiu al 50%
IgG	Immunoglobulines tipus G

ITH	“Industria Trianera de hidrogenación”
$K_{cat}$	Nombre de recanvis
$K_m$	Constant de Michaelis-Menten
LOD	Límit de detecció
$M^+$	Pic molecular
m/z	Unitat de relació massa/càrrega
MALDI-TOF-MS	“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry”
MPAP	Nom genèric del derivat monoacilat del PAP
<i>N</i> -Ac-Cys	<i>N</i> -acetilcisteïna
<i>N</i> -Ac-Cys-OMe	Éster metílic de l' <i>N</i> -acetilcisteïna
NAT	<i>N</i> -Acetiltransferasa
NADP(H)	Adenin nicotinamida dinucleòtid fosfat
OA	Oleanilida
OMS	Organització Mundial de la Salut
OO(1,2)PAP	Dioleïl éster del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-1 i en C-2
O(1)PAP	Monooleïl éster del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-1
O(2)PAP	Monooleïl éster del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-2
OO( <i>N</i> ,1)PAP	Dioleïl éster del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-1 i en N
OOO( <i>N</i> ,1,2)PAP	Trioleïl éster del del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-1, en C-2 i en N
PAA	3-( <i>N</i> -fenilamino)alanina
PAP	3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol
PBS	Tampó fosfat salí.
P(1)PAP	Monopalmitoïl éster del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol en C-1
ppm	Parts per milió
RLM	Microsomes de fetge de rata
SEM	Síndrome de l'eosinofília miàlgia
SIM	“Selected ion monitoring”
sn	Numeració estereoespecífica
SOT	Síndrome de l'oli tòxic
TE	Traçador enzimàtic
tPAP	Derivat triacilat del del 3-( <i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol
UV	Ultraviolat
$V_{max}$	Velocitat de reacció màxima

## **Capítol 1**

# **NOMENCLATURA ABREVIADA ESTABLERTA PER ALS COMPOSTOS DERIVATS DEL PAP**



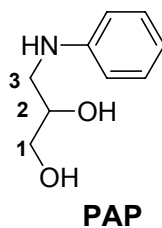
# 1. NOMENCLATURA ABREVIADA ESTABLERTA PER ALS COMPOSTOS DERIVATS DEL PAP

La comissió internacional de seguiment de la SOT adoptà una nomenclatura genèrica per als compostos relacionats amb aquestes investigacions<sup>(1)</sup>.

## 1.1. NOMS GENÈRICS DE LES ESTRUCTURES BÀSIQUES

Les estructures bàsiques dels fenilaminopropanols s'anomenen de la següent manera:

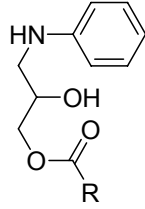
**A)** El 3-(*N*-fenilamino)propan-1,2-diol s'anomena com a PAP.



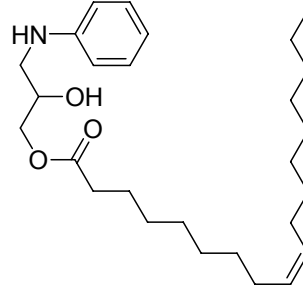
El PAP pot presentar diferents grups acil en les posicions 1, 2 i en el nitrogen de l'arilamina.



**B)** Els derivats **monoacilats** s'anomenen **mPAP**. S'utilitza **m(i)PAP** per especificar que els grups acil és a la posició i=1 o 2 del PAP.

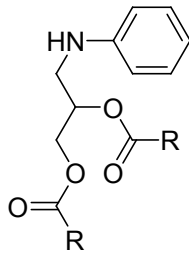


Nom genèric: **m(1)PAP**

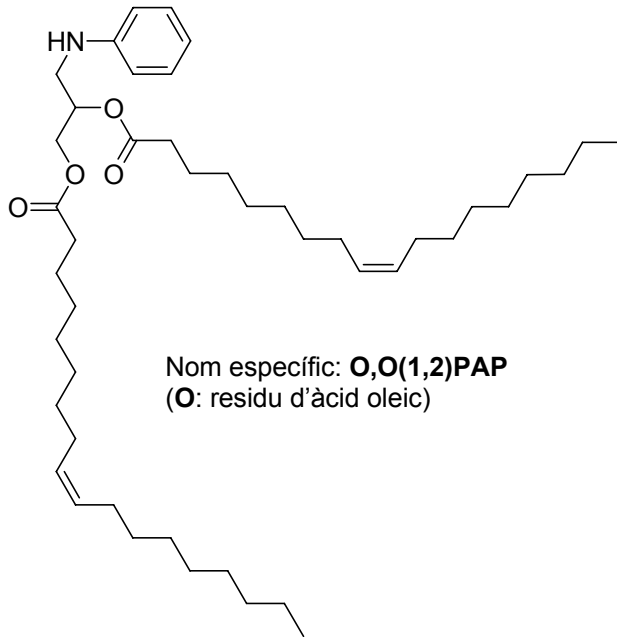


Nom específic: **O(1)PAP**  
(**O**: residu d'àcid oleic)

**C)** Els derivats **diacilats** del PAP s'anomenaran **dPAP**. S'utilitza **d(i,j)PAP** per especificar que el grup acil és a la posició i=1 i j= 2 del PAP.

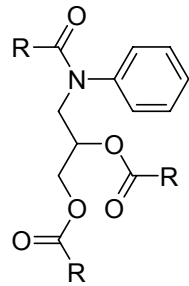


Nom genèric: **d(1,2)PAP**

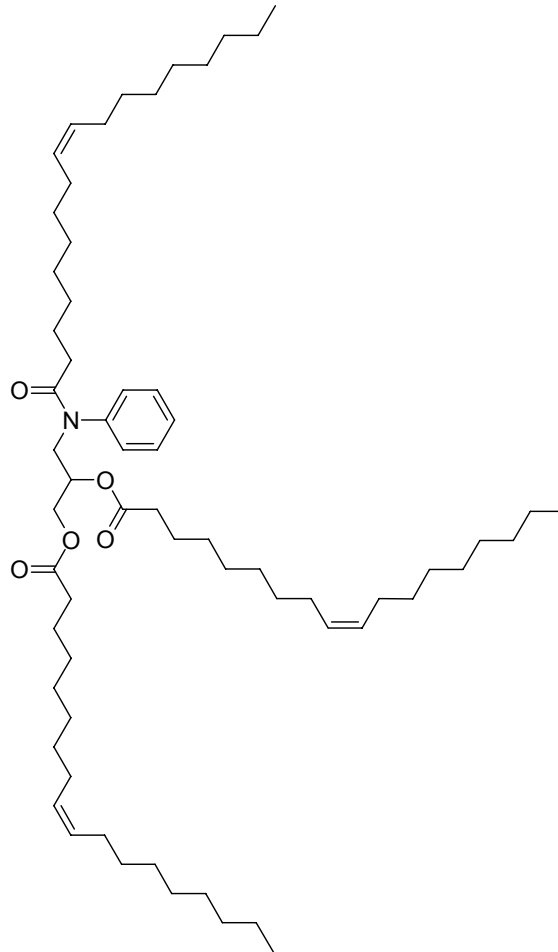


Nom específic: **O,O(1,2)PAP**  
(**O**: residu d'àcid oleic)

C) Els derivats triacilats del PAP s'anomenen tPAP.



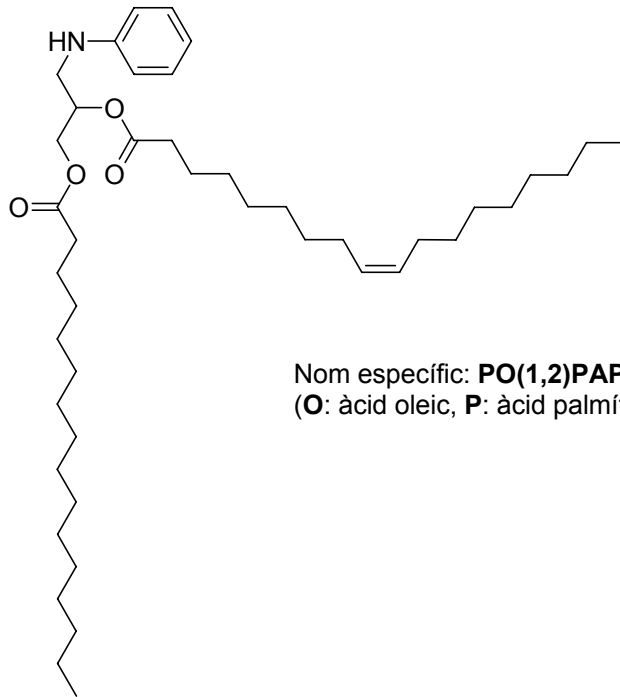
Nom genèric: **tPAP**



Nom específic: **OOO(1,2,3)PAP**  
(**O**: residu d'àcid oleic)

## 1.2. NOMS ESPECÍFICS PER ALS DERIVATS DEL PAP

S'utilitza la següent nomenclatura per identificar els diferents residus d'acil: Es posa la primera lletra del nom de l'àcid gras en majúscula, seguida per la posició en la qual es troba en l'esquelet del PAP posada entre parèntesis (1,2 o *N*) i després el nom PAP. Quan la lletra inicial coincideixi en dos àcids grassos, s'utilitza una segona. Com per exemple: àcid linoleic (L) i àcid linolènic (Ln).



Nom específic: **PO(1,2)PAP**  
(**O**: àcid oleic, **P**: àcid palmític)

**Capítol 2**  
**INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS**



## SUMARI CAPÍTOL 2

<b>2.1. LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC</b>	<b>9</b>
<b>2.2. ESTUDIS SOBRE LA SOT REALITZATS AL NOSTRE GRUP</b>	
<b>2.1.1. Estudis del metabolisme <i>in vivo</i> del PAP</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2. Desenvolupament i estudi d'un model d'oli tòxic</b>	<b>14</b>
<b>2.2. ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE ELS LÍPIDS I ELS DERIVATS DEL PAP</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1. Estereoquímica dels lípids</b>	
2.2.1.1. Nomenclatura estereoquímica dels glicèrids	18
2.2.1.2. Quiralitat dels glicèrids	20
<b>2.2.2. Lipases</b>	
2.2.2.1. Definició i antecedents	23
2.2.2.2. Especificitat	25
2.2.2.3. Colipasa	27
2.2.2.4. Migració d'acil	27
<b>2.3. ESTUDI DEL METABOLISME DEL PAP</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1. Metabolisme de xenobiòtics</b>	<b>30</b>
2.3.1.1. Metabolisme de fase I: el citocrom P450	
2.3.1.1.1. Estructura i localització	32
2.3.1.1.2. Cicle catalític	33
2.3.1.1.3. Isoenzims del CYP450 i la seva inducció	34
2.3.1.1.4. Inhibició dels CYP450s	38
2.3.1.1.5. Isoenzims del CYP450 involucrats en el metabolisme de xenobiòtics	39

2.3.1.2. Metabolisme de fase II: Sistemes conjugadors	40
2.3.1.2.1. Transferases de glutatió	41
2.3.1.2.2. Metabolisme dels adductes de GSH: àcids mercaptúrics	42
<b>2.3.2. Antecedents en l'estudi del metabolisme del PAP</b>	<b>43</b>
<b>2.3.3. Conceptes generals sobre cinètica enzimàtica</b>	<b>46</b>
<b>2.4. RELACIÓ ENTRE LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC (SOT) I LA SÍNDROME DE L'EOSINOFÍLIA-MIÀLGIA (SEM)</b>	
<b>2.4.1. Síndrome de l'Eosinofilia-Miàlgia (SEM)</b>	<b>50</b>
<b>2.4.2. Relació entre la SEM i la SOT</b>	<b>52</b>
<b>2.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP</b>	<b>55</b>
<b>2.5.1. Introducció als mètodes immunoquímics</b>	<b>56</b>
<b>2.5.2. Glossari</b>	<b>58</b>
<b>2.5.3. Immunoassaigs enzimàtics sobre suport sòlid. Mètodes ELISA</b>	<b>59</b>
2.5.3.1. ELISA competitiu	60
2.5.3.1.1. ELISA competitiu en format directe	61
2.5.3.1.2. ELISA competitiu en format indirecte	61
2.5.3.2. ELISA no competitiu	62
<b>2.5.4. Desenvolupament d'un immunoassaig</b>	<b>62</b>
<b>2.6. OBJECTIUS</b>	<b>65</b>

## 2.1. LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC

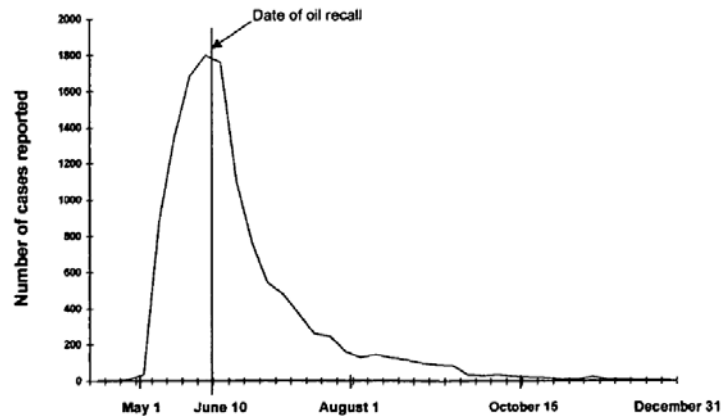
A la primavera del 1981 esdevingué a Espanya una catàstrofe alimentària de grans proporcions, on més de 20.000 persones foren afectades i prop de 400 van morir per causa del que posteriorment s'anomenà la Síndrome de l'Oli Tòxic (SOT). Com a resultat d'aquesta epidèmia, el sistema nacional de salut espanyol va haver d'encarar un dels problemes de salut pública més crítics del segle, i els efectes, tant en la societat espanyola com en la comunitat mèdica, van ser dramàtics<sup>(2)</sup>. Vint-i-sis anys després, encara hi ha un elevat nombre de pacients afectats per seqüeles cròniques. Aquest fet i el no haver trobat encara els compostos i mecanismes responsables de la síndrome, fan que el tema mantingui interès científic i sanitari.

El primer cas de l'epidèmia fou detectat l'1 de maig de 1981 a Madrid, quan un noi de 8 anys fou declarat mort en arribar a l'hospital. Al cap de pocs dies, cinc membres de la seva família amb els mateixos símptomes, incloent-hi afeccions pulmonars, mal de cap, astènia, picor i febre, van ser examinats al mateix hospital. Inicialment se'ls va diagnosticar una pneumònia atípica, i durant aquells dies el nombre de pacients d'aquesta nova malaltia que arribaven als hospitals de Madrid va créixer de manera alarmant<sup>(2)</sup>.

Després de desestimar algunes hipòtesis com la de virus, micoplasmes, o bacteris com a agents causants, els primers estudis epidemiològics van establir una certa relació entre la malaltia i el consum d'un oli contingut en garrafes de plàstic de 5 litres, sense etiquetar i de venda ambulant. Una vegada descobert aquest fet, es va fer una recollida d'aquests olis de les llars i dels mercats per tal ser analitzats<sup>(2)</sup>. Així, es va poder veure que es tractava d'un oli de colza provinent de França i inicialment destinat a ús industrial, el qual havia estat desnaturalitzat amb un 2% d'anilina. Aquest oli va ser refinat un cop arribat a Espanya, es va mesclar amb oli d'oliva i va ser distribuït il·lícitament per a consum humà a través de venedors ambulants<sup>(3)</sup>. Un dels fets que corroborava l'associació de l'oli amb la intoxicació va ser la disminució del nombre de nous afectats una setmana després



de l'anunci de la relació entre l'oli i la malaltia<sup>(2)</sup>, tal i com es mostra a la Figura 2.1.1.



**Figura 2.1.1.** Corba epidèmica, Síndrome de l'Oli Tòxic, Espanya, 1981<sup>(2)</sup>.

Tot i que algunes de les característiques clíniques de la SOT feien pensar en d'altres malalties com l'escleroderma o la "graft-versus-host", ben aviat es va veure que es tractava d'una malaltia desconeguda. La SOT es caracteritza per ser una malaltia multisistèmica que pot tenir lloc en tres fases consecutives:

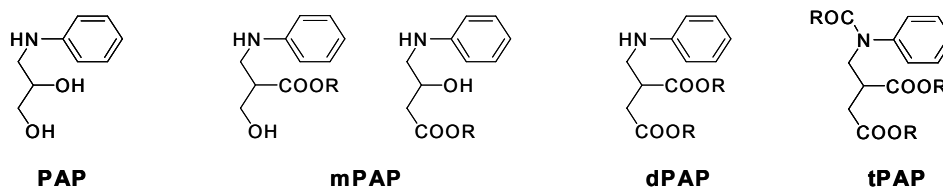
**Fase aguda:** La majoria de pacients presentaven febre, picors, eosinofília, edema pulmonar i miàlgia<sup>(4)</sup>.

**Fase intermèdia:** Després de dos mesos, els pacients passaven cap a aquesta fase caracteritzada per hipertensió pulmonar, tromboembolisme, miàlgia i eosinofília persistent, edema, alopecía i síndrome de Sicca<sup>(2,4)</sup>.

**Fase crònica:** Un 60% dels afectats han desenvolupat aquesta fase caracteritzada principalment per hipertensió pulmonar, escleroderma, neuropaties, afeccions hepàtiques i activitats musculars involuntàries<sup>(2,4)</sup>.

La malaltia tendia a formar conglomerats en famílies, però també es va detectar un risc diferent a l'hora de posar-se malalts per part de diferents membres d'una mateixa família. Aquest fet podria ser degut al consum de diferents quantitats d'oli (factor de dosi), i /o bé a factors de susceptibilitat<sup>(4)</sup>. En general, les dones foren més afectades per la síndrome (60.8%) respecte als homes, i en particular, l'edat dels afectats oscil·lava entre els 20 i els 50 anys. Les classes baixes foren els grups socioeconòmics més afectats, probablement per la tendència a comprar olis de baix preu, com era el cas d'aquest oli fraudulent de venda ambulat<sup>(2)</sup>.

Investigacions de diferents partides d'oli detectaren diverses espècies químiques derivades de l'anilina, com ara les anilides dels àcids grassos. Inicialment, aquestes anilides trobades en els olis van ser identificades com a possibles agents causants de la síndrome<sup>(5)</sup>. Tot i així, la seva relació amb la SOT no ha estat demostrada, ja que els diversos experiments, tant *in vitro* i com *in vivo*, realitzats fins ara no han estat concloents respecte a la seva toxicitat en diferents espècies animals. A més, aquestes anilides també havien estat detectades en els olis fraudulents distribuïts a Catalunya, els quals no havien mostrat toxicitat entre els consumidors. Per tant, tot indicava que aquestes anilides per si mateixes no podien ser les causants de la síndrome i es per això que són considerades com a biomarcadors de l'oli adulterat, però no del tòxic<sup>(2)</sup>. En canvi, es van descobrir altres derivats de l'anilina, presents només en els olis tòxics, que van ser identificats com a derivats del 3-(N-fenilamino)propan-1,2-diol (PAP)<sup>(6)</sup>. En concret, els seus corresponents mono- i di- esters i derivats triacilats (mPAP, dPAP i tPAP respectivament, Fig. 2.1.2.).

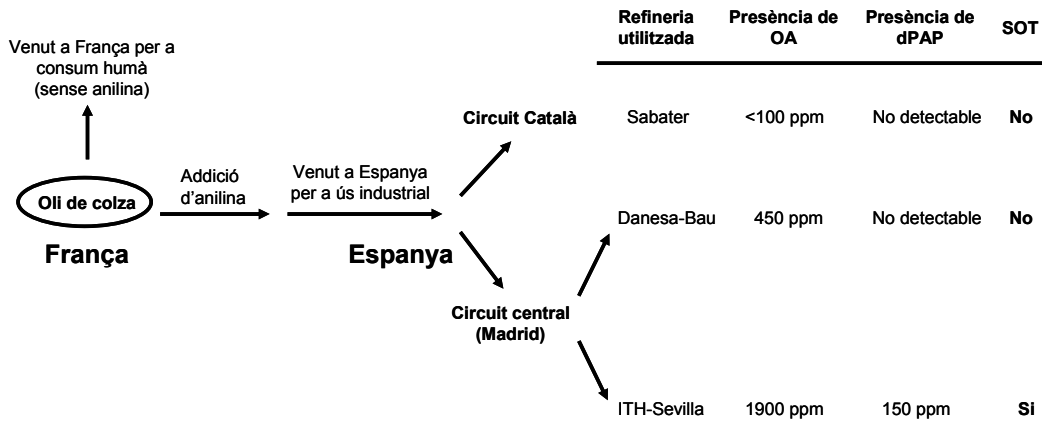


R: cadena d'àcid gras

**Figura 2.1.2.** Estructura dels derivats del 3-(N-fenilamino)propan-1,2-diol, considerats actualment com a marcadors de l'oli tòxic.

Aquests compostos, són considerats actualment com a biomarcadors de l'oli tòxic, ja que no van ser detectats en les partides d'oli que es van distribuir per Catalunya, fet que suggereix que alguna cosa de diferent va succeir durant el tractament que va tenir lloc a la refinera ITH (Industria Trianera de Hidrogenación) de Sevilla, on es va refinar la partida d'oli que va resultar tòxica.

Per tal de fer més entenedora l'etiologia de la intoxicació, a la Figura 2.1.3. es mostra de manera esquemàtica el circuit que va seguir aquest oli de colza procedent de França<sup>(2)</sup>:



**Figura 2.1.3.** Circuit detallat de l'oli de colza provinent de França i desnaturalitzat amb anilina<sup>(2)</sup>.

Fins a dia d'avui, s'ha progressat molt poc en l'elucidació de quin o quins han estat els agents responsables d'aquesta síndrome<sup>(2,7,8)</sup>. En aquest context, diversos problemes han frenat la investigació toxicològica. Entre ells cal destacar els següents:

- 1) Classificació inicial deficient de les mostres d'oli tòxic recollides.
- 2) Possibles canvis de la composició original dels olis.
- 3) Desconeixement del procés exacte emprat per refinar els olis.
- 4) Incertesa sobre la naturalesa exacta de l'agent o agents tòxics en els olis.
- 5) Manca d'un model animal per reproduir o induir les condicions de la complexa patologia de la malaltia.

## 2.2. ESTUDIS SOBRE LA SOT REALITZATS AL NOSTRE GRUP

### 2.1.1. Estudis del metabolisme *in vivo* del PAP

Durant tots aquests anys s'han dedicat molts esforços a investigar la toxicitat potencial dels olis tòxics, així com dels derivats d'anilina, en diverses espècies animals. Malauradament, fins ara no ha estat provada la seva toxicitat en cap espècie. Una possible explicació podria ser que es tractés d'una intoxicació específica d'humans. Amb tot, el comitè de la OMS que segueix el cas, continua pensant que la hipòtesi de toxicitat observada en els derivats del PAP sembla la més versemblant.

Per altra banda, diversos estudis preliminars en rates van mostrar que aquests derivats del PAP, una vegada administrats oralment a aquests animals, podien entrar a la sang per absorció limfàtica, absorbir-se pel tracte gastrointestinal i metabolitzar-se d'una manera similar a la dels fosfolípids<sup>(9,10)</sup>. Aquests resultats suggerien que els derivats esterificats del PAP podrien donar lloc a PAP una vegada entressin a l'organisme mitjançant una hidròlisi enzimàtica.

Assumint aquesta hipòtesi, i tenint en compte que no hi havia precedents sobre estudis de metabolisme *in vivo* dels derivats del PAP, dins d'un projecte liderat per la Dra. Ladona amb col·laboració amb el nostre grup, es decidí realitzar un estudi del metabolisme del PAP en un model animal. L'objectiu principal era estudiar les vies de bioactivació i d'eliminació dels metabòlits d'aquest substrat, i deduir-ne la possible rellevància toxicològica. Es van marcar mostres de PAP amb <sup>14</sup>C i es va seguir el seu metabolisme subministrant-les intraperitonealment en dues soques de ratolins (A/J i C57/BL6). Els resultats van mostrar que el PAP era eliminat a través de l'orina majoritàriament com a tal, però també van indicar que podia ser bioactivat segons la detecció de diversos metabòlits en els extractes d'orina<sup>(11)</sup>.

Atès que els derivats del PAP presenten quiralitat i podrien ser hidrolitzats estereoespecíficament per part de les lipases, calia tenir en consideració una distribució d'aquests compostos enantiomèricament enriquida i diferències en el seu metabolisme. Per aquest motiu es van dur a terme uns estudis similars als anteriors, però aquesta vegada amb els estereoisomers del PAP. En aquest cas, els resultats van mostrar una lleugera diferència a favor d'una major metabolització de l'enantiòmer (*R*)-PAP. Cal destacar també la detecció d'altres metabòlits, com ara el 4-aminofenol o conjugats del paracetamol en els extractes d'orina<sup>(12)</sup>. Els resultats d'aquests estudis del metabolisme *in vivo* del PAP es discuteixen amb més profunditat a l'apartat 2.3.2. d'aquesta memòria.

### 2.1.2. Desenvolupament i estudi d'un model d'oli tòxic

A partir d'estudis epidemiològics, es va concloure que l'oli venut en mercats ambulants havia estat el causant de l'epidèmia. L'anàlisi de mostres dels olis relacionats amb la SOT mostraven que tots ells contenien oli de colza desnaturalitzat amb un 2% d'anilina, el qual havia estat refinat per tal d'eliminar l'anilina i barrejat amb altres olis de baixa qualitat, generalment de segona premsada i greix animal.

El continu assortiment d'estàndards i compostos de referència que les investigacions toxicològiques, bioquímiques i analítiques han requerit al llarg de tot aquest temps, han fet que la Comissió Internacional de la SOT, formada entre l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i el Ministeri de Sanitat, coordinés aquestes demandes per tal que els compostos vinguessin d'una sola font. Així seria més fàcil establir comparacions entre els resultats dels diferents laboratoris i es tindria un control més fiable de les referències utilitzades. En aquest context, el nostre laboratori fou escollit des de 1987 com a font de derivats d'anilides i posteriorment de derivats del PAP que calgués sintetitzar per emprar-los com a patrons o substrats d'assaigs biològics. Entre els encàrrecs rebuts també hi ha figurat la síntesi de derivats marcats isotòpicament, tant amb isòtops estables (<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C) com radioactius (<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C)<sup>(13)</sup>. La relació entre el nostre laboratori i la OMS ha

estat vigent durant tots aquests anys i és dins aquest context on s'emmarcà també l'encàrrec de reproduir un oli tòxic model. D'aquesta manera, l'obtenció d'aquesta reproducció de l'oli tòxic podria ser utilitzada per trobar un model animal que permetés estudiar la síndrome. Aquests estudis han format part de la tesi doctoral d'Anna Morató i Jordi Escabrós.

Una de les grans incògnites fou saber en quines condicions concretes es va dur a terme el refinament a l'empresa ITH, origen de l'oli tòxic de la ruta sevillana, per tal de comprendre quin procés o processos van tenir lloc durant aquestes manipulacions de l'oli, les quals van propiciar la formació dels derivats del PAP. En aquest sentit s'han proposat diverses variants sobre el possible procés de refinament utilitzat<sup>(6,14)</sup>, però fins a estudis recents no s'ha demostrat en quines condicions té lloc la formació dels derivats de PAP<sup>(15)</sup>.

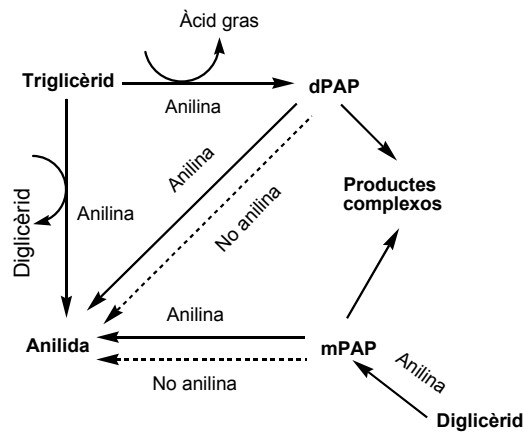
El procés convencional de refinament d'un oli inclou les etapes següents:

- 1) **Desgomatge:** Procés que té la finalitat d'eliminar els fosfolípids i determinades impureses i que es dur a terme amb àcid fosfòric.
- 2) **Neutralització:** Procés on es tracta d'eliminar els àcids grassos lliures mitjançant l'addició de sosa càustica i posterior separació gravimètrica.
- 3) **Decoloració:** Etapa d'eliminació de pigments i d'altres impureses residuals utilitzant terres decolorants.
- 4) **Desodorització:** Pretén l'eliminació de les impureses volàtils que comuniquen olors desagradables i es fa mitjançant una destil·lació al buit per arrossegament de vapor.

És precisament en aquesta última etapa on es van centrar la major part dels estudis. Els resultats obtinguts van mostrar la necessitat de dur a terme una desodorització descontrolada i aconseguir temperatures properes als 300 °C per tal que tingués lloc la formació de dPAP. Per aquest motiu va semblar interessant estudiar, mitjançant l'ajuda d'un disseny d'experiments, quins eren els factors determinants en la desodorització per tal de facilitar i accentuar la formació dels compostos derivats del PAP, concretament OOPAP, OPAP i OA, elucidant així les

condicions que es van dur a terme i que van poder diferenciar els olis catalans dels olis sevillans<sup>(15)</sup>.

Així doncs, a partir d'aquests experiments es va poder comprovar que els esters derivats del PAP seguien un procés dinàmic durant l'etapa de desodorització. Per una banda eren generats a partir de la reacció de l'anilina amb els triglicèrids, i, per l'altra, eren inestables tèrmicament, podent ser posteriorment transformats en anilides. Segons els resultats obtinguts, la formació dels diesters del PAP depenia principalment de la temperatura màxima a la qual s'arribava durant el procés de desodorització; en canvi, la dels monoesters depenia sobretot de la presència dels corresponents derivats diesterificats. Aquest equilibri podia tenir lloc gràcies a la presència d'anilina lliure a la mescla de desodorització. Per tant, si l'eliminació de l'anilina durant la destil·lació final era prou eficient, tots els esters del PAP desapareixerien sense poder ser regenerats. Si assumim aquest punt, els olis fraudulents que havien estat distribuïts per Catalunya (i en els quals no es va detectar la presència de derivats del PAP, però en canvi sí d'anilides) haurien estat el resultat d'un procés de refinament eficient des del punt de vista de l'eliminació de l'anilina. En canvi, en el cas de la desodorització que es va dur a terme a la ITH de Sevilla, l'anilina no s'hauria eliminat totalment, fent possible la generació d'esters del PAP<sup>(15)</sup> (Figura 2.1.4.).

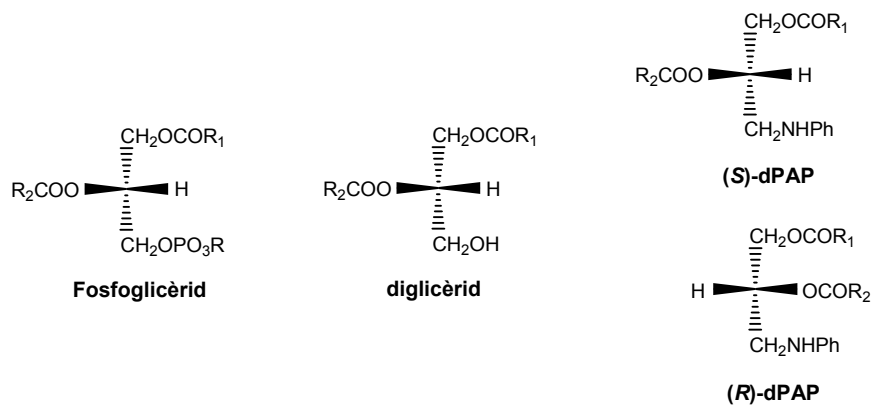


**Figura 2.1.4.** Esquema proposat per a la formació d'anilides i derivats del PAP en una mostra d'oli de colza amb un cert contingut d'anilina i que és sotmesa a un procés model de desodorització<sup>(15)</sup>.

## 2.2. ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE ELS LÍPIDS I ELS DERIVATS DEL PAP

Si ens hi fixem, es poden observar certes característiques comunes entre els derivats esterificats del PAP i alguns compostos endògens com són els diglicèrids o els fosfoglicèrids (Fig. 2.2.1.). És per això que es va pensar que els derivats del PAP podrien entrar als circuits i cascades metabòliques relacionats amb els lípids, és a dir, podrien actuar com a mimètics lipídics.

Per altra banda, cal posar de manifest que els glicèrids i fosfoglicèrids són compostos quirals, i que la quiralitat pot jugar un paper molt important en funcions biològiques específiques. Pel que fa als esters del PAP, el carboni 2 del fragment propan-1,2-diol és esterogènic. Per tant, es podria esperar una formació enantioespecífica del PAP resultant d'una hidròlisi, mediada per lipases, dels seus esters mPAP i dPAP, amb la rellevància que això comportaria.



**Figura 2.2.1.** Estructura de cadascun dels enantiòmers del dPAP comparades amb la dels fosfoglicèrids i diglicèrids.

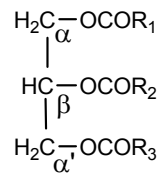
En aquest context, dades preliminars trobades per Ruiz-Gutiérrez van mostrar que quan el PAP i els seus derivats esterificats s'administraven oralment a rates, les quals tenien el canal limfàtic canulat, es confirmava la presència d'aquests productes a la fracció lipídica<sup>(9)</sup>. Aquest fet demostrava que aquests



derivats del PAP podien entrar a la sang per absorció limfàtica. Per altra banda, Closa i col·laboradors van mostrar la capacitat dels esters del PAP per ser absorbits pel tracte gastrointestinal en experiments amb rates, i metabolitzar-se d'una manera similar als fosfolípids<sup>(10)</sup>. Aquests estudis preliminars suggerien la intervenció d'una hidròlisi enzimàtica; és a dir, semblava que els derivats del PAP podien ser substrats de les lipases.

### 2.2.1. Estereoquímica dels lípids<sup>(16)</sup>

Els triacilglicèrids constitueixen la major proporció dels lípids neutres en la majoria d'organismes. Els grups hidroxil del glicerol estan esterificats normalment per àcids grassos de cadena llarga. Els dos grups hidroxil primaris del fragment de glicerol són les posicions  $\alpha$  i  $\alpha'$ , mentre que l'hidroxil secundari és la posició  $\beta$  (Fig. 2.2.2.)



**Figura 2.2.2.** Estructura d'un triglicèrid on s'indiquen els àtoms de carboni primaris com les posicions  $\alpha$  i  $\alpha'$  i l'àtom secundari com a  $\beta$ .

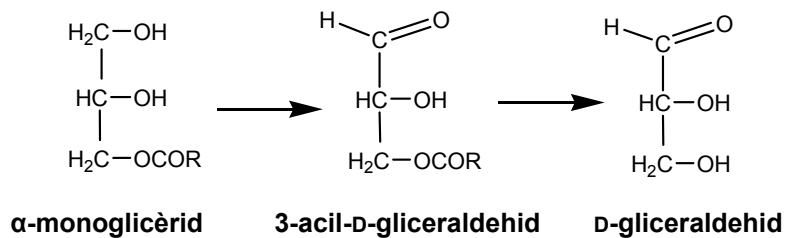
Quan  $R_1$  i  $R_3$  són diferents, el carboni  $\beta$  del glicerol és asimètric. Aleshores la molècula de glicèrid té quiralitat i per tant existeixen dues formes enantiomèriques. De fet, a la natura normalment no trobem racèmics i la majoria de reaccions biosintètiques naturals són estereoespecífiques.

L'estereoquímica clàssica no és del tot adequada a l'hora d'estudiar aquests compostos, i el glicerol n'és un exemple. Aquesta molècula havia estat considerada com a simètrica degut a la seva inactivitat òptica, però per altra banda, des del punt de vista de la reactivitat dels seus grups carbinol primaris, els

quals són diferenciats pels sistemes biològics, es tractaria d'una molècula asimètrica. Per tant, poden existir compostos simètrics que siguin diferenciats en algunes reaccions enzimàtiques.

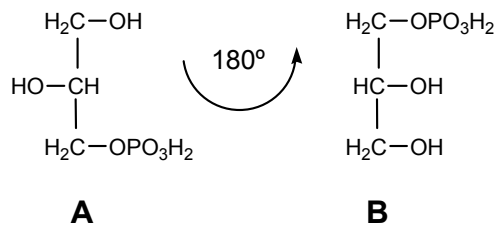
### 2.2.1.1. Nomenclatura estereoquímica dels glicèrids

Segons la convenció de Fischer, el D-gliceraldehid fou escollit com a molècula de referència. D'aquesta manera, caldria esperar que aquest sistema clàssic de nomenclatura es pogués adaptar al cas de molècules estructuralment semblants. Segons aquest sistema, es podria relacionar la configuració del glicerol o d'un  $\alpha$ -monoglicèrid amb la configuració absoluta del D-gliceraldehid (on el grup hidroxil de l'últim carboni quiral (C-2) es situa a la dreta), de la manera que es mostra a la Figura 2.2.3.

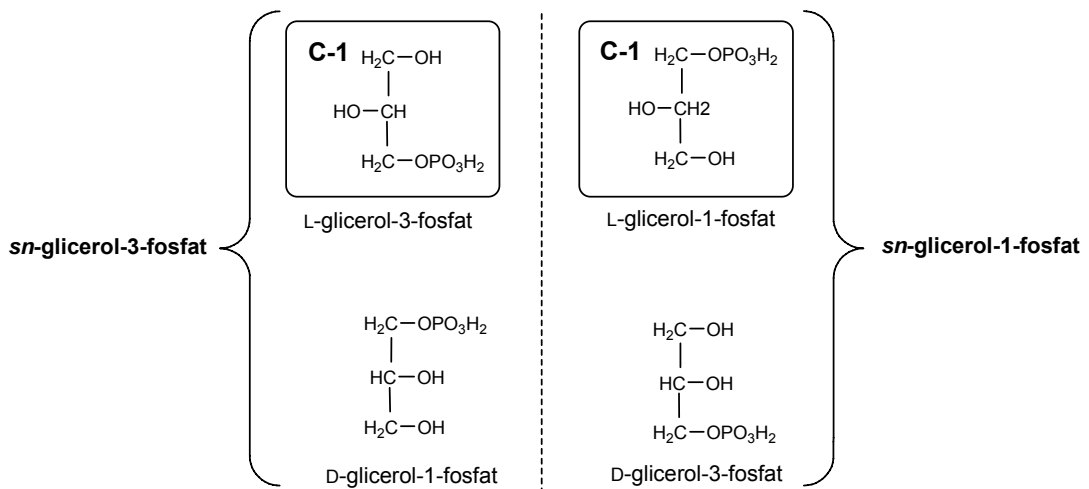


**Figura 2.2.3.** Nomenclatura dels monoglicèrids per comparació amb el D-gliceraldehid.

El primer pas de la síntesi *in vivo* de derivats quirals a partir del glicerol és la fosforilació del grup hidroxil de C-3 mitjançant una molècula d'ATP, donant com a resultat el glicerolfosfat, el qual és una molècula quiral. El compost **A** s'anomenaria L-glicerol-3-fosfat. Però si fem una rotació de  $180^\circ$  sobre **A**, sense fer cap canvi estequiomètric, obtindrem el D-glicerol-1-fosfat (**B**). Dos noms diferents, doncs, per una mateixa molècula.



Per tal de solucionar aquesta ambigüitat en la nomenclatura, es van proposar diverses adaptacions del sistema de Fischer sense massa èxit, fins que Hirschmann proposà el sistema *sn* (*stereospecific numbering*) per a glicerolípid<sup>(17)</sup>, el qual fou posteriorment adoptat i recomanat per la IUPAC. Segons aquest sistema, un derivat està estereoespecíficament numerat quan l'àtom de carboni que apareix a la part de dalt de la projecció de Fischer és designat com a C-1 i la cadena de carboni vertical té el grup hidroxil de C-2 a l'esquerra. A la Figura 2.2.4. es mostra l'exemple del *sn*-glicerol-3-fosfat i el seu enantiòmer *sn*-glicerol-1-fosfat.



**Figura 2.2.4.** Nomenclatura *sn* del glicerofosfat: a l'esquerra l'*sn*-glicerol-3-fosfat i a la dreta el seu enantiòmer *sn*-glicerol-1-fosfat. Les estructures de Fischer que responen a la terminologia *sn* es troben emmarcades mostrant el C-1 a dalt i l'OH del carboni secundari a l'esquerra. A sota es mostren les estructures equivalents amb l'OH a la dreta.

### 2.2.1.2. Quiralitat dels glicèrids

Existeixen diverses teories referents a la distribució posicional dels diferents àcids grassos en els glicèrids. Des de l'any 1960, diverses investigacions s'han

basat en l'ús de la lipasa pancreàtica (EC 3.1.1.3), un enzim que allibera àcids grassos de la posició  $\alpha$  del glicerol, però no de la posició  $\beta$ , per a aquella finalitat<sup>(18)</sup>.

Els estudis enzimàtics van revelar algunes diferències interessants quant a la posició preferida pels àcids grassos a l'hora de formar triglicèrids. En particular, es va veure que l'àcid linoleic mostrava una marcada preferència per la posició 2 en la majoria de triglicèrids de plantes. Tot i així, la majoria de generalitzacions sobre la distribució dels àcids grassos en els triglicèrids tractaven la posició 1 i 3 del glicerol com a equivalents, obviant, per tant, la quiralitat del glicèrid.

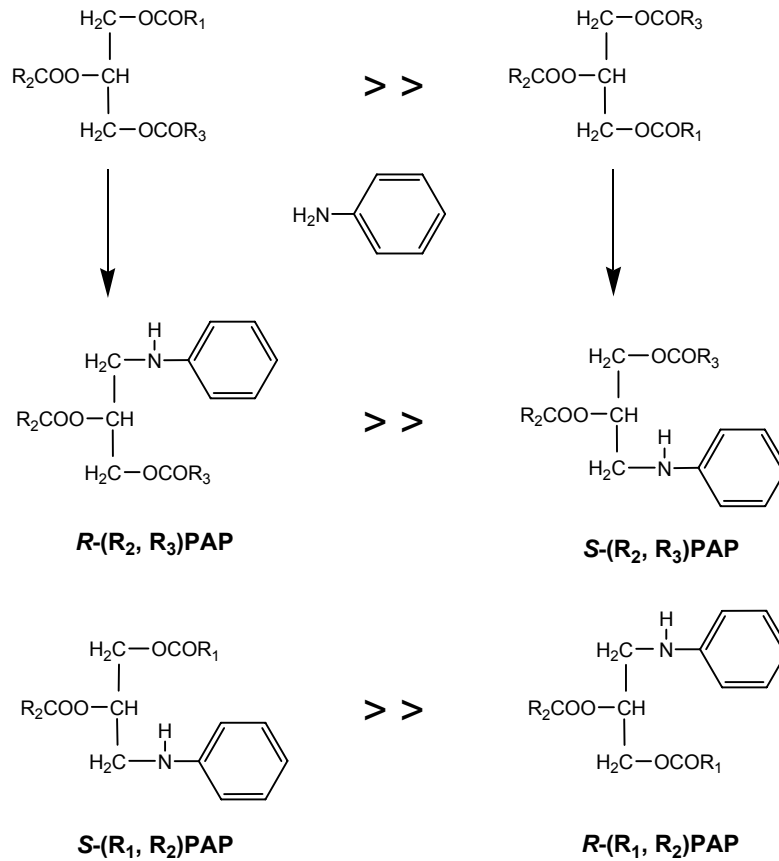
Es van emprar diverses metodologies per establir la quiralitat dels glicèrids.

- 1) **Mètodes no enzimàtics:** Emprant tècniques de resolució d'enantiòmers per derivatització o bé per mesures polarimètriques. Malauradament, els resultats no van ser gaire satisfactoris.
- 2) **Mètodes enzimàtics:** Aquests procediments involucraven l'ús d'enzims lipolítics i van mostrar que en greixos naturals s'hi podien trobar triglicèrids enantiomèrics.

Aquests experiments enzimàtics confirmaven que la composició de triglicèrids amb tres àcids grassos diferents contenia majoritàriament un enantiòmer. En concret, es va demostrar que el tractament d'un d'aquests triglicèrids amb lipasa pancreàtica donava lloc a diglicèrids, els quals, una vegada s'il·lals es podien quantificar i diferenciar, ja que augmentava la seva activitat òptica. A l'igual, uns altres experiments a partir d'una mescla de 1,2 i 2,3-diglicèrids provinents d'una hidròlisi amb lipasa pancreàtica es fosforilaven amb diclorofosfat de fenil. Aquest fragment de fosfat podia estar tant a la posició 1 com a la 3. Seguidament es tractaven amb la fosfolipasa A (EC 3.1.1.4), enzim que només accepta els *sn*-glicerol-3-fosfats com a substrat i no l'isomèric *sn*-glicerol-1-fosfat. D'aquesta manera s'aconseguia discernir la composició dels àcids grassos a cadascuna de les posicions del triglicèrid inicial.

Les dades obtingudes demostraren que les posicions 1 i 3 dels triglicèrids naturals no eren idèntiques en llur composició d'àcids grassos. Aquests resultats mostraven que els greixos naturals no eren racèmics, però no donaven una mesura directa de la pureza òptica. L'anàlisi d'olis i greixos de diverses llavors mostraren una composició similar a les posicions 1 i 3, tot i que es podia apreciar una diferència mesurable. La rellevància d'aquest fet, tot i que de vegades aquestes diferències fossin petites i semblessin a l'atzar, fou poder observar que en determinats casos hi havia un àcid gras que es situava preferentment, o fins i tot exclusivament, en una de les posicions de l'*sn*-glicerol. S'ha suggerit doncs, que els triglicèrids que deriven dels fosfoglicèrids a través d'intermedis de diglicèrids poden tenir una distribució específica dels àcids grassos. Per contra, en els triglicèrids formats per reaccions de transacilació, la seva distribució seria més a l'atzar. Aquest fet podria explicar la diversitat de patrons de distribució dels triglicèrids trobats a la natura.

Caldria posar de manifest, com s'ha explicat a la primera part de la introducció, que els derivats de PAP en estudi en aquesta tesi, considerats biomarcadors tòxics de la SOT, provenen de la reacció de l'anilina sobre els triglicèrids presents a l'oli de colza. Tanmateix, aquesta reacció no és estereoespecífica, però si alguns dels triglicèrids presents en l'oli són espècies quirals, podrien alhora generar dPAP de manera enantioselectiva, és a dir, enriquits en un dels enantiòmers. Cal tenir present, doncs, la possibilitat que aquests derivats ingerits poguessin en alguns casos no tractar-se de mesclures racèmiques, com en un inici es podria pensar. A la Figura 2.2.5. es mostra un esquema de la formació dels potencials dPAPs a partir d'un triglicèrid amb  $R_1$ ,  $R_2$  i  $R_3$ . Si la composició del triglicèrid és diferent entre els dos enantiòmers, es podria preveure la formació majoritària d'un dels enantiòmers, en aquest cas l'*S*-( $R_1$ ,  $R_2$ )PAP i l'*R*-( $R_2$ ,  $R_3$ )PAP.



**Figura 2.2.5.** Formació dels derivats diacilats del PAP (dPAP) a partir de la reacció de l'anilina amb els triglicèrids als olis tòxics. S'observa que si la composició d'un dels enantiòmers del triglicèrid és majoritària, condicionarà la composició enantiomèrica dels dPAP formats.

## 2.2.2. Lipases

### 2.2.2.1. Definició i antecedents

Segons la definició de la Comissió d'Enzims de la IUPAC, les lipases (EC 3.1.1.3) són triacilglicerol ester hidrolases, és a dir, enzims que catalitzen la hidròlisi de triacilglicèrids. Es troben en pràcticament tots els éssers vius, des dels microorganismes fins als animals superiors. Les lipases són imprescindibles per a

l'assimilació dels lípids, així com per l'emmagatzematge i posterior utilització dels greixos que utilitzem com a reserva energètica.

Els investigadors Sarda i Desnuelle van ser els primers en investigar en profunditat la lipasa pancreàtica (1958). Els seus estudis van provar que la lipasa pancreàtica, a diferència d'altres esterases, era especialment activa quan el substrat es trobava en forma d'emulsió, sent la seva activitat escassa o nul·la sobre un substrat dissolt (forma monomèrica). Aquest fenomen s'anomenà "activació interfacial" i durant molt de temps ha estat considerat com una característica de les lipases davant les esterases, les quals actuen sobre el substrat dissolt. Uns anys després, Entressangles i Desnuelle van trobar que la lipasa pancreàtica no només era capaç d'actuar sobre substrats emulsificats, sinó també sobre agregats del substrat de menor dimensió, com per exemple les micelles, en sistemes isotròpics. Posteriorment, es va proposar que el fenomen d'activació interfacial podria estar associat a un canvi conformacional de la lipasa<sup>(19)</sup>. Al 1990, Brady i col·laboradors van descobrir la presència d'una espècie de tapa en la superfície de la proteïna, coneguda com a *lid*, de manera que el centre actiu de l'enzim quedava cobert quan es trobava en solució aquosa, implicant així l'accés del substrat<sup>(20)</sup>. Aquests mateixos autors proposaren que en la conformació activa de l'enzim, aquest *lid* podia experimentar un reajustament com a resultat del qual el centre actiu passaria a ser accessible. Malgrat evidències estructurals i funcionals a favor de l'activació interfacial, no s'ha demostrat de manera conclouent que la distinció entre lipases i esterases es basi en aquest fenomen. De fet, actualment es disposa de dades bioquímiques i estructurals d'algunes lipases (com les *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida antarctica B*) que no presenten activació interfacial, és a dir, que són capaces d'hidrolitzar esters dissolts. Donat que la hidròlisi de substrats monomèrics per part d'aquests enzims implica l'accessibilitat del centre actiu sense prèvia activació interfacial, podria ser que aquest fenomen estigués relacionat amb els temps de vida respectius de les formes obertes i tancades de les lipases<sup>(21)</sup>.

Quant a la seva funció biològica, les lipases catalitzen de forma natural la hidròlisi d'esters, especialment de triglicèrids de cadena llarga, per donar lloc a

monoglicèrids, diglicèrids, àcids grassos lliures i glicerol. Per altra banda, també són capaces de catalitzar la reacció inversa, és a dir, l'esterificació i la transesterificació, en ambients microaquesos. L'equilibri entre la reacció directa (hidròlisi) i la inversa (síntesi) ve determinat per l'activitat de l'aigua en el medi de reacció. En concret, la reacció de transesterificació pot alhora classificar-se com a alcoholisi, acidòlisi o interesterificació, segons tingui lloc entre un ester i un alcohol, un ester i un àcid carboxílic o dos esters, respectivament. A més d'aquestes reaccions, les lipases també poden intervenir en d'altres més inusuals que impliquen la utilització de substàncies diferents de l'aigua i dels alcohols com a nucleòfils. Entre elles s'inclouen l'aminòlisi (reacció entre un ester i una amina primària per donar lloc a una amida i un alcohol) o la tiotransesterificació (reacció entre un ester i un tiol, enlloc d'un alcohol)<sup>(22)</sup>.

Dins l'organisme, les lipases juguen un paper fonamental en la digestió de greixos de la dieta. En un principi es pensava que la hidròlisi dels lípids alimentaris començava a l'intestí i estava catalitzada exclusivament per la lipasa pancreàtica. Es creia que l'estómac era un òrgan d'emmagatzematge, i que el seu paper estava limitat a barrejar i dispersar els lípids amb els altres nutrients. S'assumia que la digestió dels triacilglicerols per processos enzimàtics que tenien lloc a l'estómac era negligible comparat amb la que ocorria a l'intestí. En canvi, el resultat dels estudis en diferents laboratoris va indicar que la lipòlisi gàstrica era també de gran importància en la digestió de greixos. Els productes alliberats en aquest cas promouen una digestió més ràpida en el duodè per part de la lipasa pancreàtica. Per tant, la complementarietat entre la lipasa gàstrica i pancreàtica sembla ser un fenomen general en el tracte digestiu<sup>(23)</sup>.

#### **2.2.2.2. Especificitat**

L'especificitat de les lipases per actuar de forma selectiva sobre diferents substrats ve determinada per les propietats de l'enzim a nivell molecular, l'estructura del substrat i, en definitiva, pels factors que afecten a la unió enzim-substrat<sup>(24)</sup>.



En general, es coneixen els següents tipus d'especificitat:

- 1) **Especificitat posicional o regioespecificitat:** Es defineix com la capacitat de la lipasa per discriminar entre les posicions externes (1 i 3) i la posició interna (2) de l'esquelet dels triglicèrids. Així doncs podem parlar de lipases específiques **sn-1,3** o específiques **sn-2**, tot i que també existeixen lipases no específiques, com les de *Candida rugosa* i *Chromobacterium viscosum*.

L'especificitat **sn-1,3** la presenta principalment la lipasa pancreàtica, donant lloc a 2-monoglicèrids, mentre que l'especificitat **sn-2** és força inusual degut a motius estèrics. És per això que els monoglicèrids són absorbits per l'intestí majoritàriament en forma de l'isòmer 2-monoglicèrid, ja que, tot i la seva inestabilitat, és més ràpid el procés d'absorció que la reacció d'isomerització a la corresponent forma 1-monoglicèrid (vegeu apartat 2.2.2.4.).

- 2) **Especificitat respecte a l'àcid gras o acilespecificitat:** La majoria de les lipases són selectives respecte a un àcid, o més aviat, una classe d'àcids grassos amb longituds de cadena i graus de insaturació definits. L'acilespecificitat ve determinada per l'adequada acomodació de la cadena de l'àcid gras en el centre actiu de l'enzim. Així, la presència i posició de ramificacions i insaturacions poden influir en l'activitat lipàsica<sup>(25)</sup>.

Quant a la longitud de la cadena, hi ha lipases que no mostren una marcada especificitat per una longitud determinada, mentre que d'altres tenen més facilitat per hidrolitzar àcids grassos de cadena curta<sup>(26)</sup>.

- 3) **Estereoespecificitat:** Les lipases són capaces de diferenciar entre molècules enantiomèriques quan es tracta de substrats quirals i fins i tot diferenciar entre les posicions *sn-1* *sn-3* en el cas de substrats pro-quirals. La major part de les lipases estudiades davant de triglicèrids proquirals

presenten aquesta propietat, a excepció de la lipasa pancreàtica porcina<sup>(27)</sup>.

Amb tot, l'especificitat de les lipases ha donat lloc a un gran nombre d'aplicacions en camps com el de la preparació de lípids estructurats, resolució de mescles racèmiques i síntesi de compostos òpticament actius<sup>(22,26)</sup>.

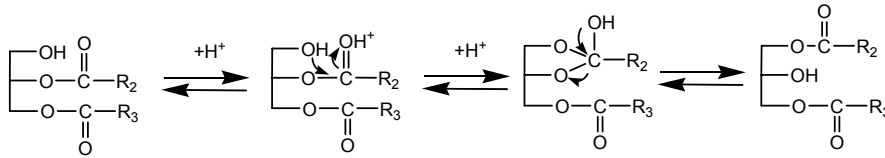
### **2.2.2.3. Colipasa<sup>(28)</sup>**

La lipasa pancreàtica pura és extremadament ineficaç en una mescla de lípids i sals biliars; en canvi, quan es troba en presència de suc pancreàtic hidrolitza els triglicèrids molt eficientment. Aquesta observació va fer pensar en l'existència d'un cofactor, el qual posteriorment fou anomenat colipasa. Existeixen dos cofactors naturals per a la hidròlisi dels glicèrids per part de la lipasa pancreàtica: les *sals biliars* i la *colipasa*. Les sals biliars poden estimular o bé inhibir les velocitats de lipòlisi depenent de les condicions particulars en què l'activitat es determina. A més, milloren la linealitat de la hidròlisi amb el temps i en fixen el pH òptim. En canvi, el factor més important de la colipasa és evitar els efectes inhibidors de les sals biliars. També estimula la velocitat d'hidròlisi en absència o presència de sals biliars i millora marcadament la linealitat de la formació del producte en funció del temps. S'ha proposat que aquests resultats siguin deguts a una unió estequiomètrica entre la lipasa i la colipasa, o bé al cobriment de la superfície del substrat per part de la colipasa, evitant així la desnaturalització de l'enzim i facilitant el seu enllaç amb la interfase.

### **2.2.2.4. Migració d'acil**

Degut a la regioespecificitat de la lipasa per actuar sobre les posicions 1 i 3 dels glicèrids, donant lloc a 2-monoglicèrids o bé 1,2- i 2,3-diglicèrids, la presència a l'organisme de 1- i 3-monoglicèrids i 1,3-diglicèrids hauria d'explicar-se mitjançant reaccions de migració d'acil.

Entenem la migració d'acil com la transferència intramolecular d'un àcid gras d'un grup hidroxil a l'altre adjacent. Aquesta isomerització la donen els monoglicèrids i els triglicèrids. Segons Serdarevich, aquesta transposició del grup acil a l'esquelet de glicerol té lloc via la formació d'un intermediari cíclic<sup>(29)</sup>, com es mostra a la Figura 2.2.6.



**Figura 2.2.6.** Mecanisme proposat per a la migració d'acil d'un 2,3-diglicèrid<sup>(29)</sup>.

Les reaccions intramoleculars poden ocórrer més ràpidament que els corresponents processos intermoleculars. La font exacta d'aquest augment de la velocitat és encara tema de discussió, però sembla que l'explicació podria trobar-se en el fet que els grups funcionals dels reactius es troben més junts, i per tant, s'incrementa la concentració local efectiva.

### 2.3. ESTUDI DEL METABOLISME DEL PAP

La SOT fou una intoxicació de tal magnitud que provocà que les autoritats es veiessin superades per les emergències mèdiques. Com a conseqüència, aspectes requerits per als experiments epidemiològics i toxicològics van quedar en segon terme. A més, cal afegir una deficient classificació de les mostres d'oli recollides que creava dubtes sobre la seva autenticitat i la rellevància dels resultats obtinguts<sup>(30)</sup>. Altres problemes que dificultaven la investigació foren la possibilitat que la composició dels olis originals canviés, així com el desconeixement del procés exacte utilitzat per refinar els olis. Però des del punt de vista toxicològic, els dos problemes més importants a l'hora d'estudiar la SOT han estat la incertesa sobre la naturalesa exacta de l'oli i la falta d'un model animal que reproduís la complexa patologia de la malaltia.

Entenem per *toxicologia* la ciència que estudia els efectes nocius dels agents químics i físics (agents tòxics) en els sistemes biològics i que estableix, a més, la magnitud del dany en funció de l'exposició dels organismes vius a aquests agents. Tot i que, compostos endògens poden ser tòxics o nocius, la toxicologia està principalment centrada en l'estudi de substàncies exògenes o *xenobiòtics*, és a dir, que no són constituents normals de l'organisme viu. Dins dels xenobiòtics s'inclourien els fàrmacs, els additius dels aliments, les toxines naturals dels aliments animals o vegetals, els residus de pesticides, els biocides i les medicines veterinàries en els aliments (o en les aigües), els productes químics industrials i els contaminants ambientals.

Dins la toxicologia podem trobar la *toxicocinètica* (estudia què fa l'organisme davant d'un xenobiòtic) i la *toxicodinàmica* (estudia què li fa el xenobiòtic a l'organisme)

La toxicodinàmica s'aplica a nivell subcel·lular (inducció i inhibició d'enzims, enllaç covalent a proteïnes, estrès oxidatiu, cicles redox, apoptosi) a nivell de teixits (proliferació cel·lular, danys de teixits, proliferació de tumors) o a nivell de tot

l'organisme (increment dels nivells en el plasma de productes endògens residuals, coma, mort) i és estudiada per experts en toxicologia molecular, patòlegs i immunotoxicòlegs.

L'absorció, distribució, metabolisme i excreció (ADME) són els fenòmens estudiats pels especialistes en toxicocinètica i biotransformació, i és en aquesta part on es centrarà aquest capítol, més concretament en el metabolisme de xenobiòtics.

### 2.3.1. Metabolisme de xenobiòtics

Tal com s'ha esmentat anteriorment, un xenobiòtic es considera qualsevol compost aliè a l'organisme, és a dir, que no ha estat biosintetitzat per ell. Els xenobiòtics hidrosolubles són fàcilment eliminables a través de l'orina o la bilis, però els que tenen un caràcter més lipòfil han de ser metabolitzats o biotransformats a través de reaccions químiques, per poder eliminar-se en forma de compostos més polars. Aquestes reaccions poden determinar també que un xenobiòtic esdevingui tòxic o que mostri una gran activitat farmacològica<sup>(31)</sup>.

De manera clàssica les reaccions metabòliques es divideixen en dos tipus:

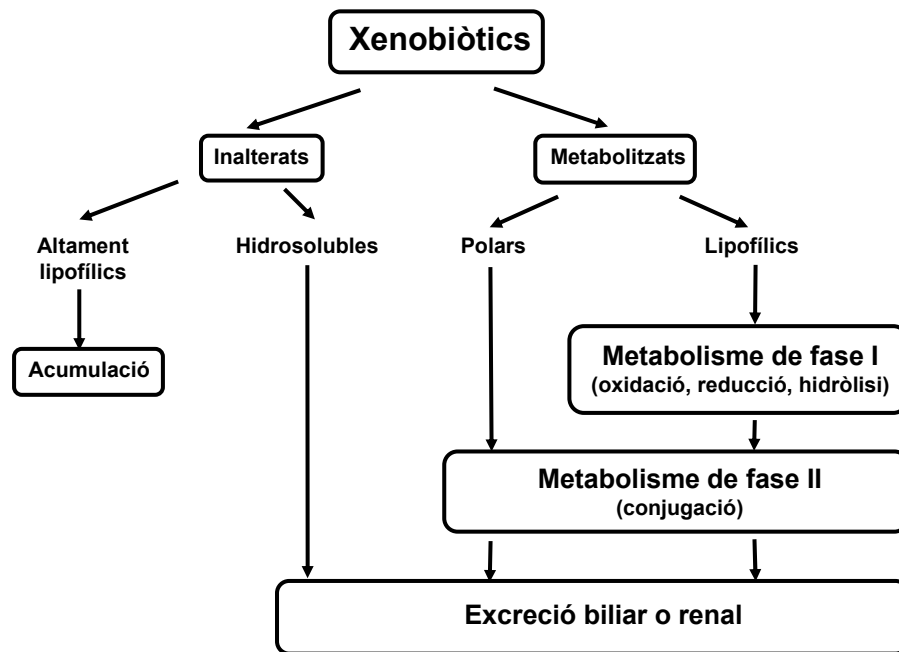
**Fase I:** Són reaccions de funcionalització del xenobiòtic i inclouen reaccions d'oxidació, reducció i hidròlisi.

**Fase II:** Constitueixen un conjunt de reaccions de conjugació que faciliten l'excreció dels metabòlits resultants del metabolisme de primera fase i que representen, per tant, una via de destoxificació.

Mentre que l'oxidació és la reacció més important de la primera fase, fonamentalment a través del sistema d'isoenzims del citocrom P450 (CYP450), dins de les reaccions de conjugació de segona fase destaquen les reaccions de glucuronidació i sulfonació. Aquestes reaccions permeten la conjugació de

compostos nucleòfils que contenen grups amino, fenol, tiol i àcid carboxílic, als àcids glucurònics i sulfònics, respectivament. D'altra part, les de conjugació amb glutatí permeten la formació d'adductes entre compostos electròfils i aquest tripèptid. En general, aquestes reaccions estan catalitzades enzimàticament.

Malgrat que la biotransformació de xenobiòtics s'ha descrit com una successió de dues etapes metabòliques, la seva eliminació no sempre requereix l'actuació de totes dues. Així per exemple, un xenobiòtic es pot eliminar inalterat o pot conjuguar-se directament a un sistema de segona fase si té un grup funcional adient. A la Figura 2.3.1. es descriuen les principals vies que pot seguir un xenobiòtic a l'entrar a l'organisme.



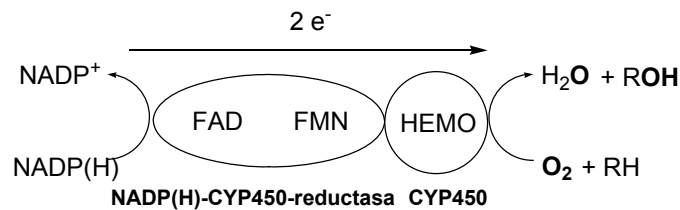
**Figura 2.3.1.** Possibles rutes a seguir per un xenobiòtic segons el seu grau de polaritat una vegada entra a l'organisme.

### 2.3.1.1. Metabolisme de fase I: el citocrom P450

#### 2.3.1.1.1. Estructura i localització

El citocrom P450 (CYP450) és una família de monooxigenases microsomals que es troben principalment a les membranes del reticle endoplasmàtic i de la mitocondria de les cèl·lules hepàtiques, tot i que també es poden trobar en les cèl·lules d'altres òrgans com el ronyó, el pulmó o l'intestí. Són hemoproteïnes consistents en una cadena peptídica d'uns 300 aminoàcids i 55 kDa, les quals contenen una anell de protoporfirina IX com a grup prostètic on el ferro, en estat d'oxidació +3, és l'àtom central. Les propietats redox d'aquest àtom donen nom al citocrom, ja que la reducció de la forma fèrrica a la ferrosa, seguida d'un tractament amb monòxid de carboni, condueix a la formació d'un complex amb una absorció intensa amb un màxim a 450 nm. Aquestes propietats redox són responsables que tingui lloc el procés d'oxidació de diferents substrats<sup>(31,32)</sup>.

El CYP450 és capaç d'inserir un àtom de la molècula de dioxigen en un substrat hidròfob, el qual esdevé més polar i pot seguir la seva biotransformació a través del metabolisme de segona fase. Per tal que aquest procés tingui lloc es requereixen dos electrons, els quals són aportats pel co-factor NADP(H) i han de ser transportats a través d'una flavoproteïna com la NADP(H)-citocrom P450-reductasa fins al grup hemo del CYP450. És a dir, el CYP450 és l'acceptor final d'una cadena de transport d'electrons que permet l'oxidació d'un substrat mitjançant la reducció de l'oxigen molecular a aigua<sup>(32)</sup>. Aquest procés es mostra a la Figura 2.3.2.

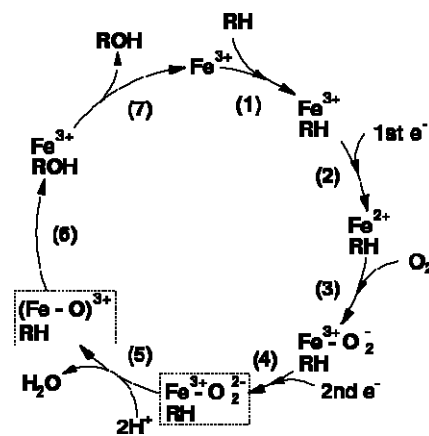


**Figura 2.3.2.** Procés d'oxidació d'una substrat RH a través de la reducció de l'oxigen molecular a aigua que duu a terme el CYP450 mitjançant dos electrons, els quals són cedits per l'NADP(H). El grup prostètic FAD de la flavoproteïna NADP(H)-citocrom P450-reductasa és l'acceptor d'aquests electrons, mentre que el grup FMN transfereix els electrons al grup hemo del CYP450.

L'NADP(H)-citocrom P450-reductasa és també una proteïna microsomal de 78 kDa que es troba al costat del CYP450. L'apoproteïna conté diferents dominis on té units els grups prostètics FAD o FMN, els quals actuen com a acceptor i donador d'electrons, respectivament, o que serveixen com a llocs d'unió amb el NADP(H) o d'interacció amb el CYP450<sup>(31,32)</sup>.

### 2.3.1.1.2. Cicle catalític

El cicle d'oxidació catalítica del CYP450 consta de diverses etapes on es produeixen dues reduccions monoelectròniques per aconseguir l'oxidació d'un substrat, segons es mostra en la Figura 2.3.3.



**Figura 2.3.3.** Cicle catalític del CYP450 on RH representa el substrat que s'oxida. En aquest cas, aquest substrat s'oxida al corresponent derivat hidroxilat ROH.

En la primera etapa té lloc la unió del substrat al CYP450, la qual va acompanyada d'una redistribució dels electrons dels orbitals d que aporta el ferro. Aquest ferro es troba, normalment coordinat a sis lligands, quatre dels quals són els nitrògens porfirínics. El cinquè lligand és el grup tiol d'un residu de cisteïna del lloc actiu de l'enzim i el sisè és, probablement, una molècula d'aigua. En aquesta situació, el sistema es troba en un estat d'espín baix on només un dels cinc electrons d es troba desaparellat ( $S=1/2$ ) i el ferro es troba en el pla de l'anell de



porfirina. La unió d'un substrat, sobretot si és hidròfob, pot desplaçar la molècula d'aigua que constitueix el sisè lligand, de manera que el ferro passa d'hexacoordinat a pentacoordinat, es desplaça per sobre del pla i el sistema passa a un estat d'espín alt ( $S=5/2$ ). Aquest fet fa augmentar el potencial de reducció del grup hemo del CYP450, el qual és capaç d'acceptar un electró, de manera que el ferro (III) es redueix a ferro (II), i aquest procés constitueix la segona etapa del cicle.

En la tercera etapa, l'oxigen molecular s'uneix també al CYP450 per formar un compost ternari de Fe-substrat- $O_2$ . La quarta etapa consisteix en una segona reducció electrònica d'aquest complex, la qual determina la velocitat del procés global. Per últim, es produeixen una successió d'etapes on tenen lloc el trencament de l'enllaç O-O per formar una molècula d'aigua, la transferència de l'altre àtom d'oxigen al substrat i finalment, la dissociació del producte oxidat del CYP450.

Fins aquí, només s'ha descrit la capacitat del CYP450 per oxidar un substrat mitjançant la inserció d'un oxigen, tot i que també és capaç de provocar la deshidrogenació de compostos hidroquinònics o aminofenòlics per donar lloc a les quinones o iminoquinones corresponents, com és el cas del paracetamol<sup>(33)</sup>.

A més, el CYP450 també pot actuar com a generador d'espècies reduïdes de l'oxigen tòxiques, com l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) o el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), si no es produeix un acoblament perfecte entre l'enzim i el substrat, o com a reductor en certes condicions anaeròbies<sup>(34)</sup>, si bé aquestes funcions no són tan freqüents.

#### 2.3.1.1.3. Isoenzims del CYP450 i la seva inducció

El CYP450 no és un únic enzim, sinó que en realitat, representa una família d'isoenzims, els quals, depenent de la similitud entre les seves seqüències d'aminoàcids, es classifiquen en famílies i subfamílies. Es creu que el primer gen de CYP450 va aparèixer fa uns dos mil milions d'anys en una cèl·lula procariota i

la seva funció era la destoxificació de l'oxigen. Des d'aleshores, ha anat evolucionant, de manera que ara es coneixen més de 200 isoenzims, els quals es troben distribuïts, fonamentalment, en cèl·lules eucariotes d'animals, tot i que també es troben en plantes i fins i tot en fongs. Aquest fet explica la importància d'aquest sistema enzimàtic.

Si dos isoenzims presenten més d'un 40% de similitud en la seva cadena peptídica, aquests dos isoenzims pertanyen a la mateixa família, la qual es designa mitjançant un número; d'altra banda, si dos isoenzims presenten una similitud del 60% o més, aleshores, també pertanyen a la mateixa subfamília, la qual ve assignada per una lletra<sup>(35)</sup>.

Exemple: CYP2D6

**CYP:** citocrom P450

**2:** família genètica (40% d'homologia)

**D:** subfamília genètica (60% d'homologia)

**6:** gen específic (isoenzim)

Els isoenzims CYP450 de les famílies 1-3 són en realitat, els isoenzims responsables del metabolisme de xenobiòtics, mentre que la resta són enzims molt específics, els quals són responsables del metabolisme endogen i produeixen, per exemple, la hidroxilació de compostos esteroidals involucrats en la regulació hormonal. Els isoenzims de les famílies 1-3 són menys específics i poden metabolitzar una gran varietat de xenobiòtics<sup>(32)</sup>. A la Taula 2.3.1. es mostren els 57 principals isoenzims humans del CYP450<sup>(36)</sup>.

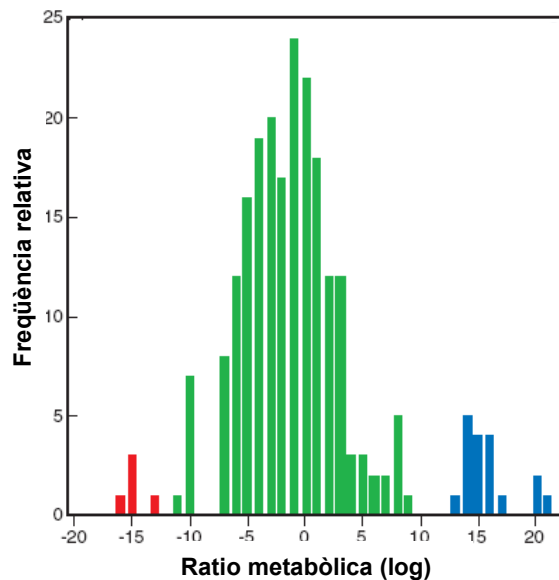
Esterols	Xenobiòtics	Àcids grassos	Eicosanoides	Vitamines	Desconegut
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

**Taula 2.3.1.** Classificació dels CYP450s humans basada en el tipus de substrat<sup>(36)</sup>.

Molts d'aquests isoenzims intervenen en el metabolisme d'esterols i vitamines A i D (substrats endògens). La resta (aproximadament una quarta part) es consideren responsables del metabolisme de xenobiòtics i, al contrari que en el cas dels isoenzims involucrats en el metabolisme endogen, els nivells d'aquests enzims activadors de xenobiòtics poden variar considerablement entre individus degut a factors genètics. Aquest fenomen és conegut com a polimorfisme genètic (coexistència de múltiples al·lels mutants d'un gen en la població a una freqüència més gran (1%) del que poden explicar les mutacions a l'atzar), i està considerat com el major determinant de la variabilitat interindividual en l'expressió d'enzims

de biotransformació i en el metabolisme de xenobiòtics<sup>(37)</sup>. Els polimorfismes sorgeixen a partir de mutacions, delacions totals o bé per multiplicacions de gens.

Com a exemple de polimorfisme genètic, a la Figura 2.3.4. es mostra la variabilitat de l'activitat *in vivo* del CYP2D6 entre la població caucàsica. L'activitat del CYP2D6 es representa com la relació entre la quantitat de fàrmac no metabolitzat (en aquest cas el fàrmac utilitzat és la debrisoquina) respecte la quantitat de metabòlit format (en aquest cas el metabòlit és la 4-hidroxidebrisoquina), ambdues espècies recollides en orina després de l'administració d'una sola dosi de fàrmac. La distribució obtinguda permet la classificació de la població en tres grups: els metabolitzadors *ultraràpids* (vermell), els metabolitzadors *extensius* (verd), que representen la majoria de la població, i els metabolitzadors *pobres* (blau)<sup>(38)</sup>.



**Figura 2.3.4.** Activitat relativa del CYP2D6 entre la població caucàsica<sup>(38)</sup>.

Les conseqüències d'aquesta variabilitat en l'activitat d'aquest isoenzim podrien ser en primer lloc una ràpida excreció del xenobiòtic en qüestió en el cas dels metabolitzadors *ultra-ràpids*, i per altra banda una acumulació a l'organisme del xenobiòtic sense metabolitzar en el cas dels metabolitzadors *lents*. Aquests fets podrien tenir implicacions positives o negatives en funció de la naturalesa del xenobiòtic, és a dir, segons es tractés d'un fàrmac o d'un agent tòxic. En qualsevol cas, caldria esperar una resposta variable en la població davant d'una determinada dosi de xenobiòtic substrat del CYP2D6. Hi ha altres isoenzims del CYP450 que presenten polimorfisme, com per exemple el CYP2C9 o el CYP2C19<sup>(38)</sup>.

Per últim, cal comentar que l'expressió dels CYP450s es troba regulada a nivell de transcripció per compostos orgànics, de manera que aquests conjunt d'isoenzims són induïbles. Així doncs, tot i que no es coneix gaire el mecanisme d'actuació d'aquests inductors<sup>(37)</sup>, llur administració sobre un determinat organisme pot afectar determinats isoenzims del CYP450, augmentant la seva producció respecte la resta. D'aquesta manera, la inducció d'un isoenzim determinat produiria els mateixos efectes que el cas d'un metabolitzador *ultra-ràpid*.

#### 2.3.1.1.4. Inhibició dels CYP450s

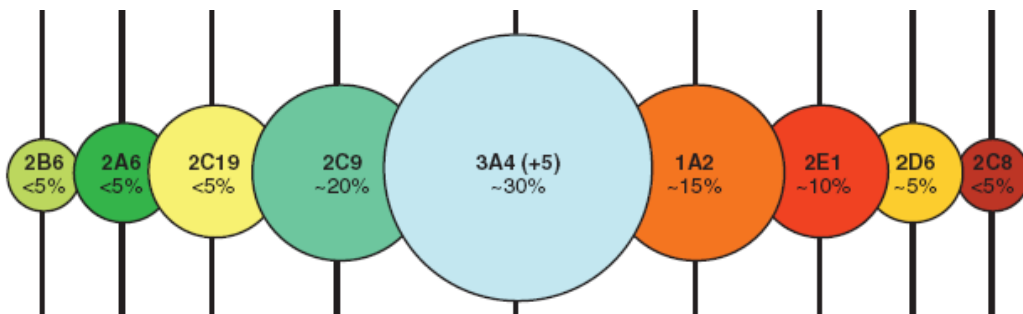
Els isoenzims del CYP450 poden ser inhibits per diferents compostos, generalment orgànics. Els inhibidors poden actuar en tres punts diferents del cicle catalític que es mostra a la figura 2.3.3. Si actuen en les etapes d'unió del substrat, o de l'oxigen al CYP450, els inhibidors són reversibles, mentre que si la inhibició té lloc després de produir-se l'oxidació d'un substrat, els inhibidors són generalment irreversibles o quasi irreversibles<sup>(32)</sup>.

Els inhibidors reversibles són competitiu si competeixen amb un substrat per la unió al lloc actiu de l'enzim, mentre que són no-competitiu si tenen una interacció amb el grup hemo, la qual va acompanyada d'un canvi en el potencial redox. Els inhibidors irreversibles són dependents de catàlisi, ja que es generen a

partir de l'oxidació d'un substrat. Els metabòlits resultants de l'oxidació d'aquest substrat inactiven el CYP450 irreversiblement, de manera que disminueixen la seva capacitat enzimàtica per seguir metabolitzant. Per aquest motiu, aquests inhibidors també s'anomenen inhibidors suïcides. La inactivació del CYP450 pot estar causada per una unió covalent de l'inhibidor a la proteïna enzimàtica o per una unió irreversible d'aquest inhibidor al grup prostètic. En aquest sentit, els experiments d'inhibició enzimàtica amb inhibidors específics dels diferents isoenzims del CYP450 tenen importància a l'hora d'esbrinar quins isoenzims estan involucrats en el metabolisme d'un xenobiòtic determinat. Per altra banda, cal esmentar també que la inhibició d'un isoenzim determinat per part del seu inhibidor específic produiria els mateixos efectes que el cas d'un metabolitzador *lent*.

#### 2.3.1.1.5. Isoenzims del CYP450 involucrats en el metabolisme de xenobiòtics

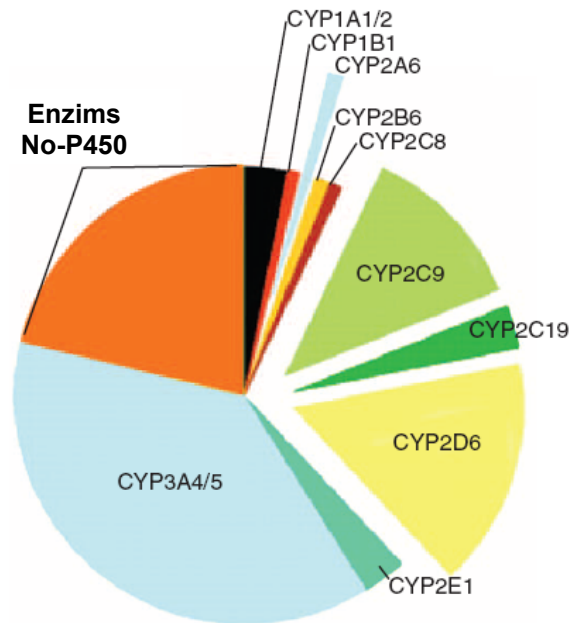
Com s'ha dit en apartats anteriors, la família del CYP450, en concret les famílies 1-3, són els principals enzims responsables de la bioactivació dels xenobiòtics. A la Figura 2.3.5. es mostra l'abundància relativa dels isoenzims d'aquestes famílies en el fetge humà<sup>(38)</sup>.



**Figura 2.3.5.** Principals isoenzims del CYP450 involucrats en el metabolisme de xenobiòtics<sup>(38)</sup>.

Es veu que l'isoenzim del CYP450 més abundant en el fetge humà seria el CYP3A4/5 (30%), seguit del 2C9 (20%) i l'1A2 (15%). Cal tenir en compte, però,

que l'abundància de l'isoenzim al fetge humà no ha de coincidir amb la seva importància a l'hora de bioactivar xenobiòtics. A la Figura 2.3.6. es mostra quina és la contribució relativa de cada isoenzim a la fase I del metabolisme de xenobiòtics<sup>(38)</sup>.



**Figura 2.3.6.** Contribució dels principals isoenzims humans del CYP450 a la fase I del metabolisme de xenobiòtics<sup>(38)</sup>.

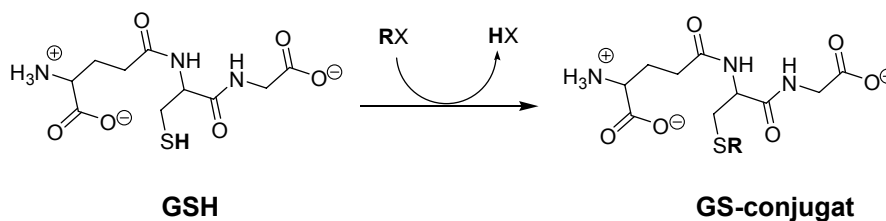
Així doncs, podem observar que l'isoenzim CYP2D6, tot i ser present en menys d'un 5% al fetge humà, participa en l'activació d'un gran nombre de xenobiòtics. En canvi, l'isoenzim 1A2, sent el tercer isoenzim més abundant en el fetge humà, no té una contribució tan important en aquest procés.

### 2.3.1.2. Metabolisme de fase II: Sistemes conjugadors

D'entre les diferents reaccions de conjugació que constitueixen el metabolisme de segona fase, l'estudi realitzat en aquesta memòria va centrar la seva atenció en la via de destoxificació que representa la conjugació a glutatió.

#### 2.3.1.2.1. Transferases de glutatió

El glutatió (GSH) és un tripèptid format per àcid glutàmic, cisteïna i glicina que té diverses funcions fisiològiques, de manera que pot actuar com a neutralitzador de radicals lliures, mitjançant oxidació al seu corresponent dímer a través d'un pont disulfur (GSSG), com a reserva de cisteïna o com a transportador d'aquest aminoàcid. Però una de les funcions més importants és la protecció que ofereix als organismes davant d'espècies electròfiles tòxiques, les quals es poden unir a aquest tripèptid a través del grup tiol del residu de cisteïna, per donar lloc a conjugats de glutatió, en una reacció catalitzada per les glutatió-S-transferases o transferases de glutatió (GST). Val a dir, però, que les reaccions de conjugació a glutatió no han de ser necessàriament enzimàtiques, sinó que també poden tenir lloc de manera espontània.



**Figura 2.3.7.** Estructura química del glutatió (GSH) i la seva reacció amb compostos electròfils (RX)

Les transferases de glutatió són un conjunt d'isoenzims que es troben majoritàriament en el citosol, tot i que també es poden trobar formant part de les membranes. Les transferases de glutatió citosòliques són proteïnes d'uns 20-28 KDa, consten de dues subunitats i cadascuna d'elles té un lloc actiu independent



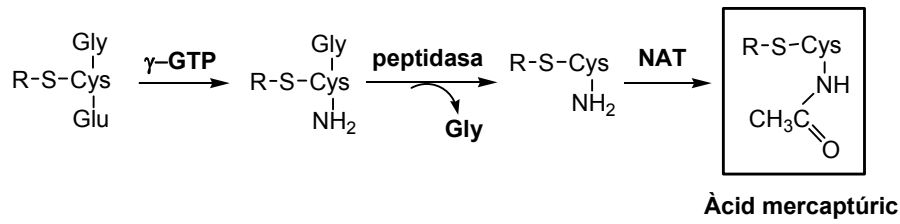
del lloc actiu de l'altra. En aquest centre actiu hi ha un lloc d'unió per a una molècula de glutatió (lloc G) i un altre lloc on s'hi uneix un substrat (lloc S), de manera que aquests composts queden molt propers en l'espai<sup>(39)</sup>. El pK<sub>a</sub> del grup sulfhidril del glutatió, el qual es manté en l'orientació adequada per tal d'interaccionar amb la zona electrofílica del substrat, disminueix de 9 a 6-7 en estar unit al lloc G, ja que forma un pont d'hidrogen amb residus de tirosina propers. Aquest fet provoca un augment de la seva nucleofília i es facilita, per tant, la reacció de conjugació entre el substrat i aquest tripèptid.

D'entre els compostos electròfils susceptibles de conjugació amb el glutatió es poden citar els haloderivats, nitroderivats, epòxids, olefines polaritzades i derivats quinònics, entre d'altres. La conjugació d'aquests composts al glutatió representa una via de destoxicació molt important, ja que si no es conjuguen a aquesta molècula poden unir-se a biomolècules amb grups nucleòfils, com diferents proteïnes les quals poden quedar inactives, o les bases de l'ADN, provocant mutagenicitat i citotoxicitat.

Els conjugats de glutatió es poden excretar directament a través de l'orina o la bilis, tot i que en ocasions, poden seguir sent metabolitzats a àcids mercaptúrics o tiols, mitjançant les vies metabòliques que s'expliquen a continuació.

#### 2.3.1.2.2. Metabolisme dels adductes de GSH: àcids mercaptúrics

Els conjugats de glutatió formats poden ser metabolitzats per una sèrie d'enzims que es troben en el citosol del fetge i el ronyó. Així doncs, la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GTP) elimina el glutamat, el qual es troba unit a la cisteïna a través del grup àcid de la seva cadena lateral, mentre que la cisteïniglicidildipeptidasa elimina la glicina, de manera que s'obté un adducte de cisteïna del xenobiòtic. Finalment, aquest conjugat de cisteïna pot ser *N*-acetilat per l'*N*-acetiltransferasa (NAT) per donar lloc a un àcid mercaptúric, el qual ja pot ser excretat<sup>(39)</sup>. La via metabòlica dels àcids mercaptúrics s'il·lustra en la Figura 2.3.8.



**Figura 2.3.8.** Metabolisme d'un conjugat de glutatió a àcid mercaptúric.  
 $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa; peptidasa: cisteïniltanspeptidasa.

L'àcid mercaptúric resultant esdevé menys polar que el seu derivat de cisteïna precursor, però la reacció d'*N*-acetilació evita la formació de la seva espècie zwitteriònica, la qual podria formar enllaços d'hidrogen intramoleculars i seria menys hidrosoluble que l'àcid mercaptúric<sup>(39)</sup>. La identificació d'aquest tipus de metabòlits en l'orina i la bilis resulta de gran importància per predir les principals vies metabòliques i de destoxificació d'un xenobiòtic.

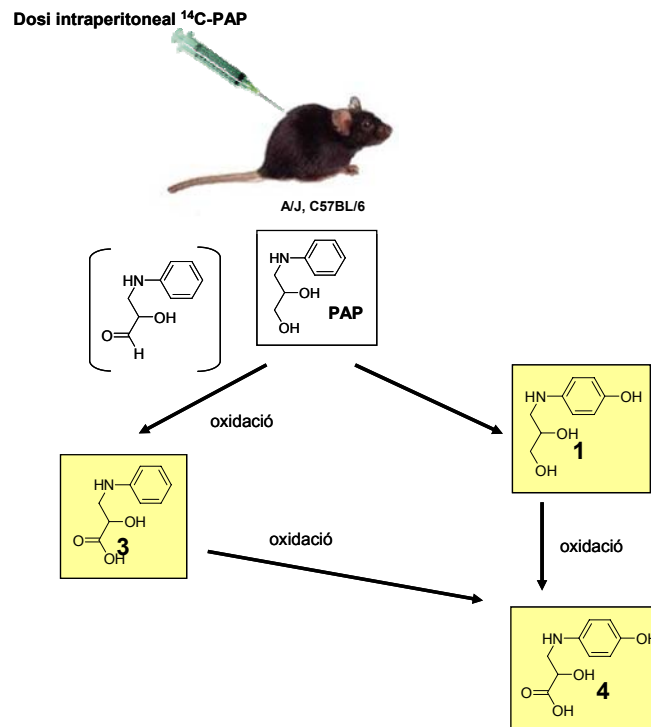
### 2.3.2. Antecedents en l'estudi del metabolisme del PAP

Fa uns anys, la Dra. M. Ladona liderà un projecte d'investigació on, assumint com a hipòtesi de treball la via dels derivats del PAP com la possible causant de la generació de l'agent tòxic, es proposava determinar els trets farmacogenètics dels diferents membres de la població involucrada, per tal d'obtenir pistes que donessin lloc a hipòtesis metabòliques que permetessin identificar l'agent tòxic. Els resultats obtinguts indicaren un increment d'al·lels defectius de l'enzim de segona fase arilamina *N*-acetiltansferasa-2 (NAT2, enzim involucrat en l'etapa d'acetilació) en els pacients relacionats amb la SOT. En aquest cas, una lenta acetilació produiria una acumulació de l'agent tòxic, fet que podria explicar, en part, que els pacients amb un major nombre d'al·lels defectius de NAT2 fossin els més afectats per la malaltia<sup>(4)</sup>.

Per altra banda, els esforços per clarificar els aspectes immunològics de la SOT han estat força fructífers, atès que s'ha determinat un perfil específic TH2 (tipus de cèl·lules T essencials en la regulació de les funcions del sistema immunològic) involucrades en pacients afectats<sup>(40)</sup>. A més, experiments amb

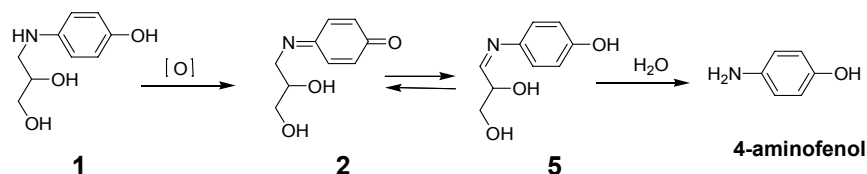
ratolins han reproduït un patró d'activació de limfòcits com a conseqüència de l'administració d'oleanilida (OLA). Aquests resultats van conduir a emprar les soques de ratolins A/J i C57BL/6 com a model autoimmune degut a la similitud observada respecte als pacients de la SOT<sup>(41)</sup>.

Posteriorment, tal com s'introdueix a l'apartat 2.1.1. d'aquesta memòria, el nostre grup participà en un projecte, també liderat per la Dra. M. Ladona, on es pretenia veure si el PAP es metabolitzava i, si la resposta era positiva, identificar els metabòlits formats de manera que fos possible aclarir les vies implicades en la seva biotransformació. Per tal de fer aquest estudi, es van marcar mostres de PAP amb <sup>14</sup>C i es va seguir el seu metabolisme subministrant-les intraperitonealment en les dues soques de ratolins mencionades anteriorment. L'estudi va permetre justificar la formació dels compostos indicats en la Figura 2.3.9., essent l'àcid carboxílic **3** el principal metabòlit detectat als extractes d'orina<sup>(11)</sup>.



**Figura 2.3.9.** Estructures dels principals metabòlits detectats a l'orina després de subministrar intraperitonealment <sup>14</sup>C-PAP a dues soques de ratolins<sup>(11,12)</sup>.

A continuació, es van realitzar uns estudis similars però subministrant als ratolins els estereoisòmers del PAP enlloc del PAP racèmic. Els resultats van mostrar una lleugera diferència a favor de la metabolització de l'enantiòmer (*R*)-PAP. A més, es van detectar d'altres metabòlits com ara el 4-aminofenol o conjugats del paracetamol en els extractes d'orina. Aquest fet suggeria, per primera vegada, la formació *in vivo* d'un intermedi potencialment tòxic a partir del PAP, com és el cas de la iminoquinona **2** a través d'un mecanisme com l'il·lustrat a la Figura 2.3.10.<sup>(12)</sup>



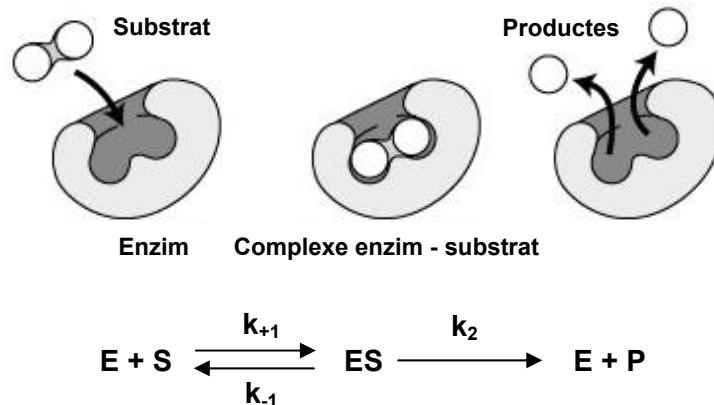
**Figura 2.3.10.** Esquema proposat per a la formació de 4-aminofenol a partir del fenol **1**<sup>(12)</sup>.

Amb tot, aquests estudis van permetre observar la importància de les vies oxidatives de l'organisme a l'hora de metabolitzar el PAP, on l'àcid 2-hidroxi-3-(*N*-fenilamino)propanoic (**3**) fou detectat com a metabòlit majoritari, indicant que la via principal d'excreció del PAP passava a través de l'oxidació de l'àtom de carboni terminal. No obstant, també es van detectar espècies oxidades a l'anell aromàtic, com el 3-[*N*-(4'-hidroxifenil)amino]propan-1,2-diol (**1**) i la iminoquinona **2**. D'altra banda, està descrit que aquestes iminoquinones poden seguir una via de detoxificació a través de l'addició de nucleòfils endògens com ara el glutatió en reaccions tipus Michael. En aquest context, l'estudi *in vitro* de la biotransformació del PAP, tant en sistemes de fase I com en sistemes conjugadors de fase II, podria aportar més informació sobre la possible formació d'espècies potencialment tòxiques com són aquestes iminoquinones<sup>(42,43)</sup>.

### 2.3.3. Conceptes generals sobre cinètica enzimàtica

La cinètica enzimàtica és la branca de l'enzimologia que estudia la velocitat de les reaccions catalitzades per enzims, com és el cas del CYP450. Aquests estudis proporcionen informació directa sobre el mecanisme de reacció catalítica i de l'especificitat de l'enzim. Els factors més importants a l'hora de determinar la velocitat d'una reacció són: la concentració d'enzim (E), la concentració de lligand (substrats, productes, activadors i inhibidors), el pH, la força iònica, i la temperatura<sup>(44)</sup>.

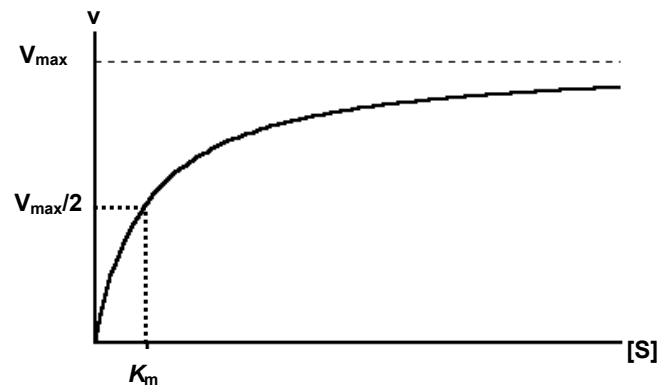
En el cas de reaccions monosubstrat catalitzades enzimàticament s'aplica el model de *Michaelis-Menten*, on primer té lloc la formació reversible del complex enzim-substrat (ES) i posteriorment es produeix la reacció donant lloc al producte (P). A continuació l'enzim queda lliure i pot començar una nova catàlisi (vegeu Figura 2.3.11)<sup>(45)</sup>.



**Figura 2.3.11.** Etapes proposades per Michaelis-Menten per a la transformació catalítica del substrat S en el producte P.

El model de Michaelis-Menten assumeix que  $k_2$  és suficientment petita per no afectar a la reacció d'equilibri de formació del complex ES, és a dir que l'etapa limitant és l'etapa de formació del producte. En aquestes condicions, quan la

concentració de substrat és baixa, només una fracció del nombre de molècules d'enzim estarà formant part del complex ES. A mida que s'incrementa la concentració de substrat, la concentració del complex ES també augmenta, i per tant s'incrementa la velocitat global de la reacció. En presència d'altres concentracions de substrat, totes les molècules d'enzim estaran formant part del complex ES, és a dir que l'enzim es trobarà saturat. En aquesta darrera situació, un increment de la concentració de substrat no comportarà un augment de la velocitat de reacció, per tant, podem dir que existeix una velocitat de reacció màxima ( $v_{\max}$ ) per a una concentració d'enzim donada<sup>(45)</sup>.



**Figura 2.3.12.** Representació gràfica de la velocitat de reacció ( $v$ ) respecte la concentració de substrat ( $[S]$ ). A altes concentracions de substrat, la velocitat arriba a un valor màxim ( $v_{\max}$ ).  $K_m$  representa la concentració de substrat a una velocitat igual a la meitat de  $v_{\max}$ .

Si considerem la raó de la formació del complex ES:

$$v_{\text{formació}} = k_{+1}[E][S]$$

$$v_{\text{dissociació}} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Assumint que la concentració del complex ES es manté constant, la seva velocitat de formació haurà de ser igual que la seva velocitat de dissociació, per tant podem escriure:

$$k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$[E][S] / [ES] = (k_{-1} + k_2) / k_{+1}$$

Si considerem  $(k_{-1} + k_2) / k_{+1} = K_m$  i  $[E]_{total} = [E] + [ES]$ , aleshores:

$$[ES] = [S] ( [E]_{total} - [ES] ) / K_m$$

$$K_m [ES] = [S][E]_{total} - [ES][S]$$

$$[ES] (K_m + [S]) = [S][E]_{total}$$

$$[ES] = [S][E]_{total} / (K_m + [S])$$

Assumint que la velocitat global de la reacció ve donada per  $v = k_2 [ES]$  obtenim l'equació de Michaelis-Menten:

$$v = v_{max} [S] / (K_m + [S])$$

On  $v_{max} = k_2 [E]_{total}$

Així,  $K_m$  és la constant de dissociació dinàmica de l'enzim i és característica per a cada parella enzim-substrat. Per tant, quant menor sigui el valor d'aquesta constant de dissociació, més afinitat tindrà l'enzim pel substrat. Per altra banda,  $v_{max}$  és un paràmetre que depèn de la concentració d'enzim. Per aquest motiu, de vegades és preferible utilitzar la constant  $k_{cat}$ , també anomenada *nombre de recanvis*, on:

$$k_{cat} = v_{max} / [E]_{total}$$

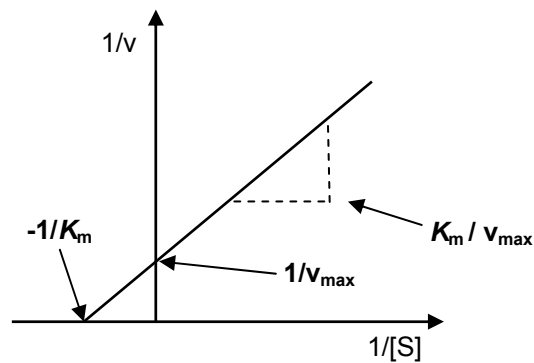
Per tant,  $k_{cat}$  expressa el nombre màxim de molècules de substrat que l'enzim pot transformar en producte per unitat de temps.

La relació  $k_{\text{cat}} / K_m$  determina la velocitat de reacció relativa a concentracions de substrat baixes i es coneix com a constant *d'especificitat*. Aquest paràmetre ens dóna informació sobre la eficàcia de l'enzim i té un valor màxim igual a  $k_{+1}$ .

La forma hiperbòlica de la representació de la velocitat en front de la concentració de substrat fa molt difícil determinar la  $v_{\text{max}}$  i la  $K_m$  d'una reacció catalitzada per un enzim. Per aquest motiu se sol utilitzar l'equació de Lineweaver-Burk, la qual deriva de l'equació de Michelis-Menten:

$$1/v = K_m / (v_{\text{max}} [S]) + 1/v_{\text{max}}$$

Així, si representem  $1/v$  respecte  $1/[S]$  obtindrem una recta on  $K_m / v_{\text{max}}$  serà la pendent i  $1/v_{\text{max}}$  l'ordenada a l'origen, tal com es mostra a la Figura 2.3.13<sup>(46)</sup>.



**Figura 2.3.13.** Representació gràfica de l'equació de *Lineweaver-Burk* on la  $v_{\text{max}}$  s'obté a partir de la inversa de la intercepció amb l'eix d'ordenades, i la  $K_m$  s'obté a partir de la inversa de la intercepció amb l'eix negatiu de les abscisses.



## 2.4. RELACIÓ ENTRE LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC (SOT) I LA SÍNDROME DE L'EOSINOFÍLIA-MIÀLGIA (SEM)

La Síndrome de l'Oli Tòxic (SOT) ha estat relacionada en diverses ocasions amb una intoxicació de caire semblant que va tenir lloc al 1989 als Estats Units, anomenada Síndrome de l'Eosinofília-Miàlgia (SEM). La nostra experiència prèvia en l'estudi del metabolisme del 3-(*N*-fenilamino)propan-1,2-diol (PAP) (vegeu apartats 2.1.1 i 2.3.2) i la similitud estructural entre el PAP i la 3-(*N*-fenilamino)alanina (PAA) (Figura 2.4.1.), marcadors tòxics de la SOT i la SEM, respectivament, van fer que ens plantegéssim un possible vincle addicional entre ambdues malalties suggerint a més una possible via de toxicitat. En concret, es va decidir estudiar la possible formació *in vitro* d'intermedis iminoquinònics a partir de la PAA, els quals poden ser potencialment tòxics<sup>(42)</sup>.

### 2.4.1. Síndrome de l'Eosinofília-Miàlgia (SEM).

A l'octubre de 1989 a l'estat de Nou Mèxic, el Dr. Philip A. Hertzman i el seus col·legues van comparar notes sobre tres pacients amb símptomes clínics inusuals com ara miàlgia, astènia, úlceres orals, dolor abdominal, erupcions cutànies, leucocitosi i eosinofília. El fet que els tres pacients haguessin desenvolupat aquests símptomes després de l'administració oral d'L-triptòfan, feu pensar en aquest aminoàcid com a agent causant de la malaltia. Posteriorment, els departaments de salut de Nou Mèxic començaren una investigació del cas que va revelar nous casos amb símptomes similars, on la majoria estaven associats a la ingestió d'L-triptòfan. Poc després es reportaren casos provinents d'altres estats, fet que indicava que la malaltia no estava tenint lloc exclusivament a aquest estat<sup>(47)</sup>.

Degut a que poc a poc el nombre d'organitzacions implicades en les investigacions anava creixent, calia definir un nom per a la síndrome. Fou així com al novembre de 1989 es decidí anomenar la malaltia Síndrome de l'Eosinofília-

Miàlgia (SEM), ja que semblava que l'eosinofília (alt nivell de eosinòfils a la sang) i la miàlgia severa (dolor muscular) eren els símptomes més característics de la síndrome, sent els altres (fatiga, mal de cap i refredats) més variables. Els problemes respiratoris, bàsicament tos i dispnea, també eren força prominents. Cal esmentar que des d'un primer moment, es va relacionar la SEM amb la SOT degut a les característiques comunes entre ambdues malalties (vegeu apartat 2.4.2)<sup>(47)</sup>. El previ i ampli coneixement d'una malaltia com la SOT, va ser de gran ajuda per als investigadors nord-americans a l'hora d'identificar la SEM com a una nova malaltia, facilitant també la direcció en els estudis clínics i epidemiològics<sup>(2)</sup>.

Un mes després de la detecció dels primers casos de la síndrome, l'FDA (Food and Drug Administration) va promoure la retirada del mercat de tots els productes que continguessin L-triptòfan, i va ser llavors quan la incidència de casos va decreixer ràpidament, fet que corroborava la relació entre la intoxicació i el consum d'L-triptòfan<sup>(47)</sup>. Estudis epidemiològics posteriors van associar la SEM amb uns lots concrets d'L-triptòfan fabricats per la companyia japonesa Showa Denko K.K. Després d'analitzar els lots, es van identificar principalment tres contaminants: el 1,1'-etilidenebis(triptòfan) (EBT), la 3-(N-fenilamino)alanina (PAA), i el 2-(3-indolilmetil)triptòfan (IMT)<sup>(48,49)</sup>. Tot i que la naturalesa i mecanismes toxicològics de l'agent responsable de la SEM encara no han estat establerts, diferents estudis s'han focalitzat en la PAA i els seus productes de biotransformació com els possibles causants de la intoxicació.

A dia d'avui, es considera que el nombre total d'afectats fou 1511, dels quals 38 van morir. Tot i que els Estats Units va ser el país més afectat per la SEM, s'han descrit casos de la síndrome a d'altres països: Alemanya (97 casos), França (24 casos), Canadà (16 casos), Bèlgica i Suïssa (3 casos), Regne Unit i Japó (2 casos), i Espanya i Austràlia (1 cas). Un dels factors que podrien haver provocat la diferència en el nombre d'afectats per la SEM als Estats Units respecte la resta de països, podria ser que als Estats Units es permet vendre L-triptòfan sense prescripció mèdica, a diferència dels altres països, afavorint possiblement el seu consum. Un altre factor podria haver estat la diferència en els patrons comercials, possiblement resultat d'una estratègia de mercat més baixa de l'L-triptòfan fora

dels Estats Units<sup>(47)</sup>. Quant a l'edat i gènere dels afectats, la mitjana d'edat era de 48 anys, i un 84% dels pacients eren dones. Aquestes dades podrien explicar-se, en part, pel fet que l'L-triptòfan és un aminoàcid utilitzat com a antidepressiu i com a suplement dietètic, i aquests tractaments són seguits majoritàriament pel gènere femení adult<sup>(50)</sup>.

### 2.4.2. Relació entre la SEM i la SOT

Diferents estudis han establert relacions entre la Síndrome de l'Eosinofília-Miàlgia (1989, EUA) i la Síndrome de l'Oli Tòxic (1981, Espanya), inicialment per la coincidència en els símptomes clínics, tal com es mostra a la Taula 2.4.1.

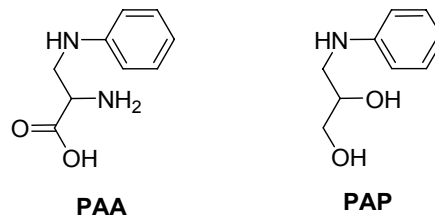
	SEM	SOT
<b>Miàlgia</b>	☆☆☆☆	☆☆☆☆
<b>Eosinofília</b>	☆☆☆☆	☆☆☆☆
<b>Erupcions cutànies</b>	☆☆	☆☆☆
<b>Hipertensió pulmonar</b>	☆	☆
<b>Enrampades</b>	☆☆☆	☆☆
<b>Esclerodèrmia</b>	☆	☆☆☆
<b>Fatiga</b>	☆☆☆☆	☆☆☆
<b>Neuropatia</b>	☆☆	☆☆

**Taula 2.4.1.** Quadre clínic comparatiu entre la SEM i la SOT<sup>(1,47)</sup>.

A part de la simptomatologia, cal esmentar que ambdues síndromes mostraven característiques similars a les malalties autoimmunes, especialment en

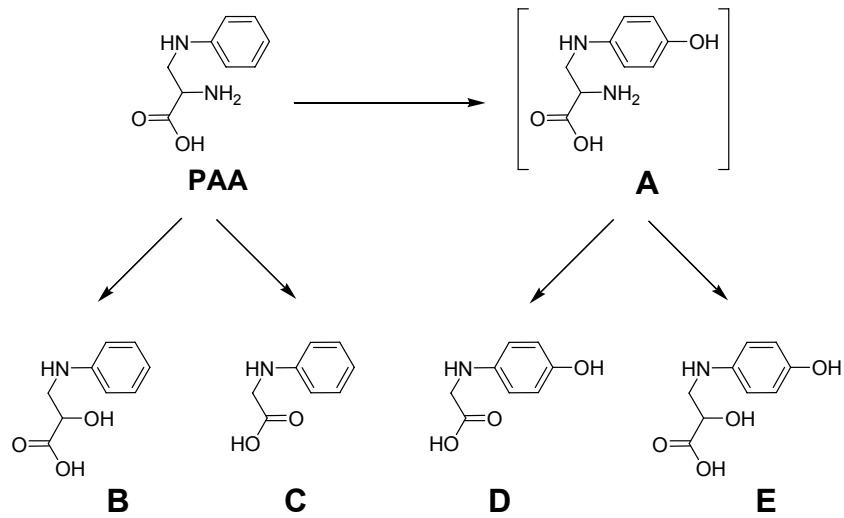
la fase crònica. I a més, les dues intoxicacions van afectar majoritàriament dones adultes<sup>(2)</sup>.

Al 1992, Mayeno i col·laboradors van definir l'estructura d'un dels contaminants dels lots d'L-triptòfan implicats en la intoxicació. Es tractava de la 3-(*N*-fenilamino)alanina (PAA), compost químicament similar al PAP, tal com s'indica a la Figura 2.4.1. A més, es demostrà que els pacients de la SEM havien ingerit quantitats significativament més elevades de PAA i d'un altre contaminant (EBT) respecte els casos control<sup>(51)</sup>. Per tant, tot apuntava cap a la PAA com a possible agent causant de la SEM, i és per això que els estudis posteriors es van centrar bàsicament en aquest compost.



**Figura 2.4.1.** Estructura química de la PAA i del PAP, possibles agents causants de la SEM i la SOT, respectivament.

Així, es van realitzar estudis del metabolisme *in vivo* de la PAA mitjançant l'administració d'aquest compost sobre rates Wistar. Els resultats van mostrar la detecció en orina de quatre metabòlits (**B**, **C**, **D**, **E**), dos dels quals (**D** i **E**) es podrien haver generat via l'intermedi **A**<sup>(52)</sup>, tal i com es mostra a la Figura 2.4.2.



**Figura 2.4.2.** Metabòlits detectats en orina després de l'administració de PAA sobre rates Wistar<sup>(52)</sup>.

Cal destacar la coincidència de dos dels metabòlits (**B** i **E**), detectats després de l'administració de PAA sobre rates, amb dos dels metabòlits (**3** i **4**), detectats després de l'administració de PAP també sobre rates (vegeu Figura 2.3.9). Aquest fet, posava de manifest un vincle entre la SEM i la SOT.

Per altra banda, es va veure que incubacions de PAP en presència de cèl·lules hepàtiques de rata i teixit hepàtic humà donaven com a resultat la seva biotransformació en PAA, mitjançant probablement varies etapes d'oxidació i una transaminació<sup>(53)</sup>. D'aquesta manera, s'establia una altra relació entre la SOT i la SEM, en aquest cas a través de la transformació del PAP (marcador tòxic de la SOT) en PAA (marcador tòxic de la SEM).

En definitiva, tots aquests fets associen clarament les dues síndromes, els agents causants de les quals encara no han estat identificats de manera inequívoca.

## 2.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP

Tal i com es descriu a la primera part de la introducció, es van identificar els derivats del PAP com els principals contaminants presents en els olis que van provocar la intoxicació, i, fins avui, han estat considerats com a biomarcadors de l'oli tòxic. El contingut de PAP en els olis tòxics és molt baix, però tenint en compte que els esters del PAP podrien seguir processos de degradació enzimàtica una vegada ingerits, donant PAP en un últim estadi <sup>(9,10,54)</sup>, calia pensar en la possibilitat de detectar aquest compost en mostres biològiques després de l'administració de l'oli tòxic en un model animal adient. Recentment, s'ha publicat un mètode analític altament fiable de detecció d'anilides i principals derivats esterificats del PAP mitjançant la tècnica d'HPLC-MS<sup>(55)</sup>. En canvi, el desenvolupament de mètodes de detecció del PAP ha resultat ser més complicat, degut en part a la seva alta polaritat. En aquest context, els mètodes immunoquímics d'anàlisi, els quals tenen lloc en medis aquosos, serien una excel·lent alternativa a les tècniques cromatogràfiques.

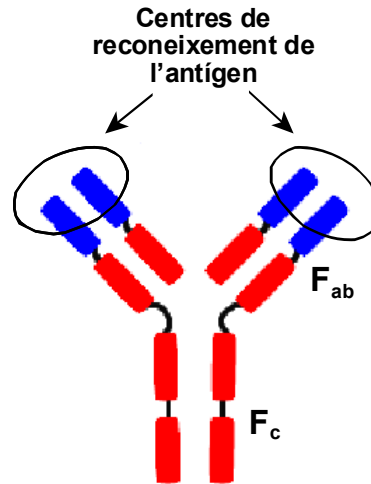
Així doncs, un dels objectius d'aquest treball va ser posar a punt un assaig immunoquímic per al PAP com a mètode de detecció. Els immunoassaigs es basen en la reacció sensible i selectiva anticòs-antigen i en la capacitat del sistema immunitari per produir anticòssos com a resposta a substàncies alienes al organisme<sup>(56)</sup>. Inicialment utilitzats per a anàlisis clíniques, aquests mètodes han trobat més recentment aplicacions en el camp del control de contaminants ambientals, donat que permeten analitzar una gran quantitat de mostres ràpidament, a baix cost, són de fàcil utilització i requereixen poca o cap preparació prèvia de mostra.

### 2.5.1. Introducció als mètodes immunoquímics

Les tècniques immunoquímiques es van originar a finals dels anys 50, quan Yallow i Berson publicaren el desenvolupament del primer assaig immunològic quantitatiu capaç de detectar insulina humana a nivell de picograms en mostres de fluid corporal. D'aleshores ençà, les tècniques immunoquímiques han experimentat un gran desenvolupament, esdevenint eines indispensables en anàlisi clínica i, més recentment, en anàlisi mediambiental per a la detecció de traces de contaminants<sup>(56,57)</sup>.

Els mètodes immunoquímics es basen en la capacitat del sistema immunitari dels vertebrats de generar anticossos com a resposta a la presència de molècules alienes o antígens. Aquests anticossos són immunoglobulines de tipus G (IgG), produïdes pels limfòcits B i tenen una massa d'aproximadament 150 KDa. Donat que cada clon de cèl·lules B produeix un únic tipus d'anticòs, i que els anticossos es poden formar com a resposta a diferents epítops de l'antigen, el sèrum resultant conté una barreja d'anticossos denominats anticossos policlonals<sup>(56)</sup>. L'aïllament i posterior cultiu d'un d'aquests clons de limfòcits B permetria disposar d'una font d'anticossos monoclonals, idèntics entre ells.

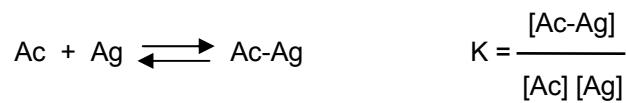
L'estructura d'una IgG consta de dos parells de cadenes polipeptídiques, dues de pesants i dues de lleugeres, unides per ponts disulfur. Les diferents regions de l'estructura d'una IgG es troben representades a la Figura 2.5.1. A la regió Fab (antibody binding fraction) s'hi troba la Fv (variable fraction), és característica de cada IgG i que constitueix el centre d'unió i reconeixement de l'antigen, marcant-ne l'especificitat. La regió Fc (crystallized fraction) és una fracció constant, característica de cada espècie i que participa en la regulació de la resposta immune dels mamífers.



**Figura 2.5.1.** Representació de l'estructura d'una immunoglobulina (IgG).

La base de la interacció anticòs–antigen són els enllaços no covalents que estableixen entre ells. Aquestes interaccions són principalment de tipus Van der Waals i electrostàtiques, juntament amb enllaços d'hidrogen i interaccions hidrofòbiques. El fet que es requereixin distàncies curtes perquè aquestes interaccions siguin significatives implica que es necessari un encaix que afavoreixi la interacció entre càrregues oposades i això determina la selectivitat i especificitat d'aquests mètodes<sup>(56,57)</sup>.

La formació del complex anticòs–antigen (Ac-Ag) és un procés reversible i una vegada ha assolit l'equilibri, es pot definir una constant K, la qual és una mesura de l'afinitat de l'anticòs per l'antigen<sup>(56)</sup>.



D'entre les diverses tècniques immunoquímiques, les més emprades són els assaigs immunològics (IA, immunoassay), els quals fan ús de marcadors per la detecció de la reacció immunològica. Quan aquests marcadors són radioisòtops es



parla d'assaigs radioimmunològics (RIA, radioimmunoassay), mentre que els marcadors de tipus enzimàtic com la peroxidasa de rave picant (HRP) o la fosfatasa alcalina caracteritzen els assaigs immunoenzimàtics (EIA, enzyme immunoassay). En els darrers anys s'ha incrementat l'ús de marcadors fluorescents i quimioluminiscent. En funció del format de l'immunoassaig, el marcador s'incorpora a l'Ac o a l'Ag.

### 2.5.2. Glossari

Per tal de facilitar el seguiment d'aquest capítol, a continuació s'inclou un glossari dels termes més habituals en immunoquímica<sup>(56)</sup>.

**Afinitat:** mesura de la força d'interacció entre un determinat antigènic i un anticòs.

**Anticòs (Ac, IgG):** proteïnes produïdes pel sistema immunitari dels vertebrats com a defensa enfront de substàncies alienes o antígens. Els anticòsos s'uneixen a llocs específics de l'antigen. Els anticòsos que s'utilitzen als immunoassaigs pertanyen a la classe de les immunoglobulines de tipus G (IgG).

**Anticòsos monoclonals:** Anticòsos produïts per un únic clon de limfòcit B. Són idèntics entre ells i s'uneixen a un únic lloc antigènic de l'immunogen.

**Anticòsos policlonals:** Mescla d'anticòsos, cadascun d'ells produït per un clon de limfòcits B. Poden unir-se a diferents llocs antigènics de l'immunogen.

**Antigen:** Qualsevol molècula que pot unir-se específicament al lloc d'unió d'un anticòs.

**Antigen de recobriment (Ag):** Haptè estructuralment relacionat amb l'analit. Es troba unit a una proteïna portadora i s'immobilitza sobre un suport sòlid en els assaigs de tipus EIA.

**Antisèrum (As):** Sèrum que conté els anticossos policlonals contra un antigen objectiu.

**Epítop o determinat antigènic:** Part de la molècula de l'antigen que es reconeguda selectivament per un anticòs.

**Haptè:** Molècula petita degudament funcionalitzada per a la unió amb una proteïna portadora o enzim marcador i, que per tant, pot donar lloc a una resposta immunitària.

**Immunogen:** Compost que pot originar una resposta immunitària en una espècie hoste, induint la producció d'anticossos.

**Proteïna portadora:** proteïna a la qual s'uneix l'haptè per esdevenir immunogènic.

**Traçador enzimàtic (TE):** Haptè estructuralment relacionat amb l'analit, conjugat amb un enzim i que s'utilitza en els ELISA com a competidor en els formats directes.

### **2.5.3. Immunoassaigs enzimàtics sobre suport sòlid. Mètodes ELISA**

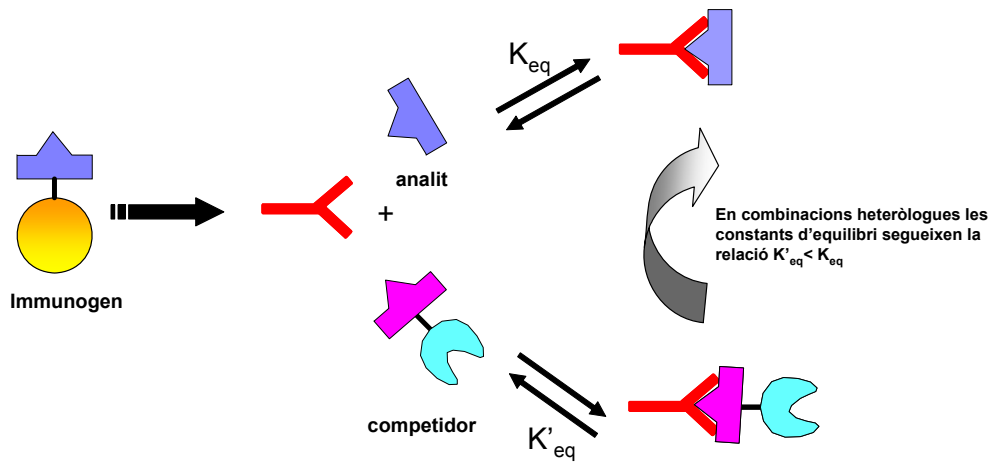
Els EIA van ser introduïts a començaments dels anys 70. El format més comú utilitza l'immunoreactiu (Ag o Ac) immobilitzat sobre un suport sòlid. Aquest format s'anomena ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) i permet una fàcil separació, mitjançant rentats, de la fracció lliure respecte de la fracció unida a

l'immunoreactiu immobilitzat. A continuació es presenten els formats d'ELISA més emprats.

### 2.5.3.1. ELISA competitiu

La capacitat de l'antisèrum (As) per reconèixer un analit de pes molecular petit es determina amb assaigs ELISA de tipus competitiu. En aquests assaigs la mesura de l'activitat enzimàtica del marcador està relacionada amb la concentració d'analit present, i es basen en la competència que s'estableix entre l'analit (An) i l'antigen de recobriment (Ag) o bé el traçador enzimàtic (TE), segons el format utilitzat, per a la unió amb l'anticòs (Ac). Així doncs, en presència de l'An s'inhibeix la unió de l'Ag o del TE amb l'Ac, resultant en una disminució de l'absorbància final de la mostra, la qual és proporcional a la concentració d'analit.

Segons el principi d'heterologia, l'afinitat de l'Ac pel competidor disminuirà en funció de les diferències estructurals d'aquest respecte l'haptè emprat a la preparació de l'immunogen, i per tant de l'An. D'aquesta manera els equilibris representats a la Figura 2.4.2. poden modular-se en funció de l'estructura dels competidors de l'assaig<sup>(57,58)</sup>.



**Figura 2.5.2.** Esquema dels equilibris que s'estableixen en un ELISA competitiu.

Existeixen diversos formats d'ELISA competitiu. Els més utilitzats s'expliquen a continuació.

#### 2.5.3.1.1. ELISA competitiu en format directe

Aquest format presenta l'avantatge de reduir el nombre d'etapes de treball i, per tant, el temps de l'assaig, si bé té l'inconvenient d'exposar el marcador enzimàtic a components de la matriu a analitzar que poden afectar la seva activitat<sup>(56)</sup>. Hi ha dues variants possibles, segons quin sigui l'immunoreactiu immobilitzat sobre el suport sòlid:

##### **a) Format de tapissat amb l'Ac.**

En aquest format s'immobilitzen els anticossos sobre la placa i s'estableix una competició entre l'An i el TE en dissolució per la unió amb l'anticòs. Els reactius que romanen en dissolució s'eliminen amb els rentats de la placa. L'activitat enzimàtica resultant és inversament proporcional a la quantitat d'An present (vegeu la Figura 2.5.3.-A).

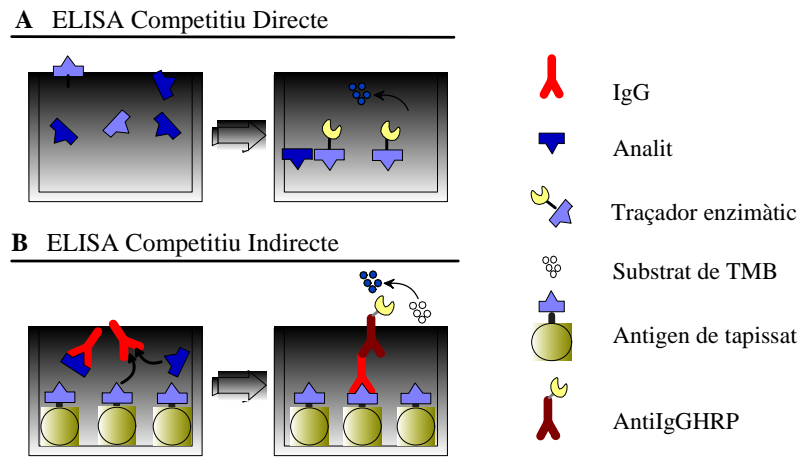
##### **b) Format de tapissat amb l'Ag.**

En aquest format s'immobilitza l'Ag sobre el suport sòlid i competeix amb l'An en dissolució per una determinada quantitat d'Ac marcat amb l'enzim.

#### 2.5.3.1.2. ELISA competitiu en format indirecte

En aquest format l'Ag s'immobilitza sobre el suport sòlid i s'estableix una competència entre aquest i l'An per unir-se a l'Ac, trobant-se els dos últims immunoreactius en dissolució. És necessari incloure una etapa addicional per obtenir una resposta quantificable, la qual requereix un segon anticòs, denominat antiIgG, el qual reconeix específicament els anticossos de conill i que té unit covalentment un enzim. En aquest assaig el marcador no està en contacte amb els components de la matriu analítica, però l'assaig comporta una etapa addicional

de treball (vegeu la Figura 2.5.3-B). És en aquest format on s'han centrat els estudis immunoquímics d'aquest treball.



**Figura 2.5.3.** Representació esquemàtica dels diversos formats d'ELISA competitiu.

### 2.5.3.2. ELISA no competitiu

Els ELISA no competitiu utilitzats en aquest treball tenen els mateixos formats que els descrits per als ELISA competitiu (directe i indirecte), si bé l'analit hi és absent. L'objectiu d'aquests assaigs és avaluar el reconeixement dels As pels diferents competidors, els Ag (format indirecte) o bé els TE (format directe). En aquest treball també s'han emprat per optimitzar les condicions de treball dels assaigs competitiu.

### 2.5.4. Desenvolupament d'un immunoassaig

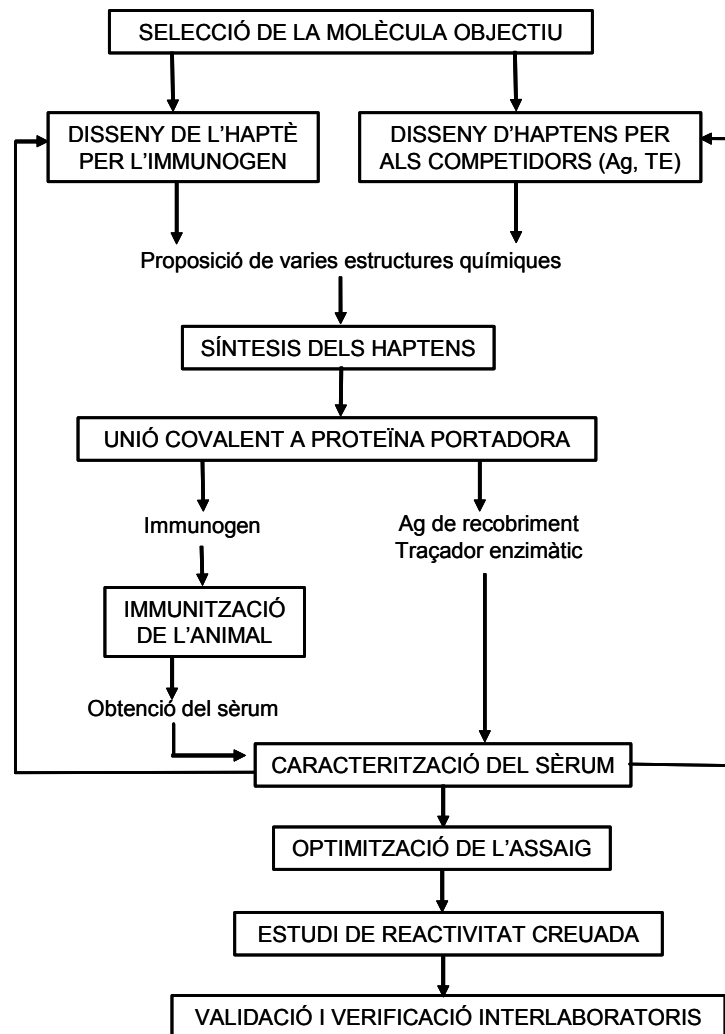
Les molècules orgàniques amb pesos moleculars inferiors a 1 KDa no són capaces d'activar una resposta immunitària per si soles, de manera que s'ha de recórrer a la unió covalent amb macromolècules portadores, generalment proteïnes, per generar una resposta immune en l'animal hoste. La unió entre la

molècula orgànica i la proteïna es fa a través d'un braç espaiador, el qual separa una mica la molècula objectiu de la proteïna per minimitzar l'efecte apantallant d'aquesta i perquè la molècula estigui més exposada a l'exterior. El conjunt format per la molècula i el braç espaiador s'anomena haptè, i el conjunt format per l'haptè i la proteïna s'anomena antigen. L'antigen utilitzat per crear anticossos en l'animal hoste, habitualment conills, s'anomena immunogen<sup>(56,57)</sup>. D'aquesta manera, gran part de l'esforç del desenvolupament d'un ELISA s'inverteix en l'obtenció de l'immunogen.

Per altra banda, tal i com s'ha vist a l'apartat 2.4.3., per a la realització d'assaigs ELISA són necessaris altres immunoreactius obtinguts igualment per unió de molècules orgàniques degudament funcionalitzades a proteïnes (en el cas dels antigens de recobriment) o bé a enzims marcadors (en el cas de traçadors enzimàtics). Un correcte disseny de l'immunogen, així com dels Ag i TE serà la clau de cara a l'obtenció d'un ELISA amb la sensibilitat i especificitat desitjades.

Quant al disseny de l'immunogen, l'haptè corresponent ha de conservar al màxim les característiques químiques de l'analit. La unió del braç espaiador a la molècula objectiu s'ha de fer de manera que la part més característica d'aquesta quedi exposada al sistema immunitari. S'ha d'escollir la longitud i estructura del braç espaiador perquè es redueixi el reconeixement d'aquest i optimitzi l'exposició de la molècula objectiu al sistema immunitari. No és convenient doncs, que el braç espaiador tingui grups funcionals que modifiquin la distribució electrònica de la molècula objectiu, ni que sigui molt voluminós, per evitar que es formin anticossos contra ell. La longitud òptima del braç espaiador és de 3 a 6 àtoms, ja que espaiadors amb longituds superiors poden provocar un plegament de l'haptè, reduint-ne l'exposició al sistema immunitari. També, s'ha de tenir en compte el comportament dels diferents grups funcionals davant del metabolisme dels animals immunitzats i la possible formació de productes de degradació. Per últim, el braç espaiador de l'haptè ha de contenir un grup funcional adequat per a la unió covalent a la proteïna portadora<sup>(57,58)</sup>.

Pel que fa al disseny dels Ag i TE, s'ha de basar en la utilització d'anàlegs estructurals de l'An que puguin ser reconeguts per part de l'As. D'acord amb el principi d'eterologia anteriorment esmentat, la introducció de petites diferències estructurals afavorirà el reconeixement d'As i An, i millorarà la sensibilitat de l'assaig<sup>(57,58)</sup>. A la Figura 2.5.4. es mostren de manera esquemàtica les etapes necessàries per desenvolupar un immunoassaig per una molècula inicialment no antigènica.



**Figura 2.5.4.** Diagrama esquemàtic de les etapes necessàries per desenvolupar un immunoassaig per una molècula no antigènica *per se*.

## 2.6. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball es basa en l'estudi de la SOT des del punt de vista de la possible biotransformació dels derivats del PAP a l'organisme, així com la posada a punt d'un mètode analític que permeti detectar aquests derivats en fluids biològics. En concret, els objectius d'aquesta memòria són:

- 1) Estudi dels derivats del PAP com a substrats de la lipasa pancreàtica humana i de l'estereoselectivitat d'aquest enzim en el procés de hidròlisi.
- 2) Estudi del metabolisme de fase II del PAP mitjançant la síntesi dels corresponents adductes de glutatió i *N*-Ac-Cys i l'estudi de la seva estabilitat.
- 3) Estudi de la bioactivació *in vitro* del PAP per part dels enzims CYP450 en presència de microsomes hepàtics, i determinació dels principals isoenzims del P450 involucrats en aquest procés.
- 4) Estudi de la bioactivació *in vitro* de la PAA en presència d'HLM i de l'estabilitat dels seus metabòlits per tal d'establir un nou vincle de unió entre la SEM i la SOT.
- 5) Desenvolupament d'un ELISA per a determinar PAP en mostres o fluids biològics.





## **Capítol 3**

### **PUBLICACIONS**



## SUMARI CAPÍTOL 3

### 3.1. Publicació I

Studies on the toxic oil syndrome: Stereoselective hydrolysis of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol esters by human pancreatic lipase (2004) *Chem. Res. Toxicol.* 17, 889-895.

Resum	69
Article	71
Supplementary material	78

### 3.2. Publicació II

Synthesis and stability studies of the glutathione and *N*-acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for toxic oil syndrome (2005) *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1721-1728.

Resum	83
Article	85
Supporting Information	93

### 3.3. Publicació III

*In vitro* bioactivation of 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol by human and rat liver microsomes and recombinant P450 enzymes. Implications for toxic oil syndrome (2007) *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1218-1224.

Resum	97
Article	99
Supporting Information	106

#### **3.4. Publicació IV**

Generation of quinoneimine intermediates in the bioactivation of 3-(*N*-phenylamino)alanine (PAA) by human liver microsomes. A potential link between the eosiniphilia-myalgia syndrome and teh toxic oil syndrome (2007) *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1556-1562.

Resum	109
Article	111
Supporting Information	118

#### **3.5. Publicació V**

Studies on toxic oil syndrome: development o fan enzyme-linked immunosorbant assay for 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol in human urine (enviat a *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Novembre 2007).

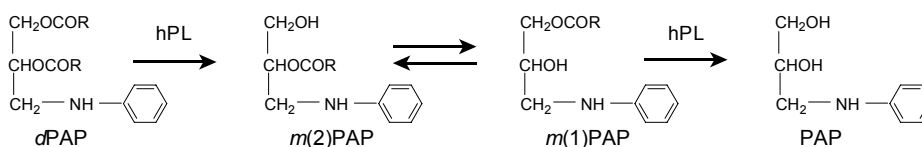
Resum	121
Article	123

### 3.1. Publicació I

Anna Morató, Anna Martínez-Cabot, Jordi Escabrós, Jordi Bujons, and Angel Messeguer. Studies on the toxic oil syndrome: Stereoselective hydrolysis of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol esters by human pancreatic lipase (2004) *Chem. Res. Toxicol.* 17, 889-895.

#### Resum

La síndrome de l'oli tòxic (SOT), una intoxicació que va tenir lloc a Espanya al 1981 i que va afectar a més de 20000 persones i va causar més de 400 morts, va ser provocada per la ingestió d'un oli de colza adulterat amb un 2% d'anilina, refinat il·legalment i distribuït per al consum humà a través de venedors ambulants. Malgrat els esforços esmerçats fins ara, l'elucidació dels agents causants d'aquesta síndrome no ha estat possible a dia d'avui. Tot i així, diferents estudis epidemiològics apunten als derivats esterificats del 3-(*N*-fenilamino)1,2-propandiol (PAP) com a biomarcadors dels lots d'oli tòxic. L'estructura d'aquests esters del PAP fa pensar en la dels triglicèrids, fet que suggereix que aquests esters podrien seguir fins a cert punt la ruta del metabolisme de lípids. Incubacions del dioleïl ester del PAP racèmic en presència de lipasa pancreàtica humana va donar lloc a la formació estereoselectiva respecte l'enantiòmer *S* dels corresponents monoesters amb el residu d'àcid gras situat a C-2. Aquests monoesters són inestables i estableixen un equilibri amb el corresponent regioisòmer esterificat a C-1. Aquest equilibri té lloc aparentment sense la intervenció de la lipasa pancreàtica. Per últim, incubacions d'aquests monoesters del PAP en presència de lipasa pancreàtica humana van donar lloc a la formació dels corresponents enantiòmers del PAP. En aquest cas, també es va observar certa estereoselectivitat a favor de l'enantiòmer *S*. Amb tot, aquests resultats mostren que els esters del PAP són substrats de la lipasa pancreàtica humana i que els dos processos d'hidròlisi suggereixen una resolució cinètica a favor dels enantiòmers *S*.

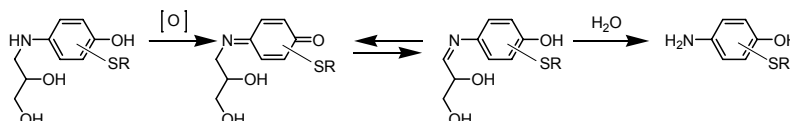


### 3.2. Publicació II

Anna Martínez-Cabot, Anna Morató, and Angel Messeguer. Synthesis and stability studies of the glutathione and *N*-acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for toxic oil syndrome (2005) *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1721-1728.

#### Resum

Diferents estudis epidemiològics indiquen els derivats mono- i diesterficats del 3-(*N*-fenilamino)1,2-propandiòl (PAP) com a biomarcadors del lots d'oli del colza causants de la síndrome de l'oli tòxic (SOT), una intoxicació que va tenir lloc a Espanya al 1981 i que va afectar a més de 20000 persones i va provocar més de 400 morts. La biotransformació del PAP administrat intraperitonealment en dues soques de ratolins va mostrar la formació de metabòlits potencialment tòxics. La identificació del 3-(4'-hidroxifenilamino)1,2-propandiòl d'entre els metabòlits formats resulta de gran importància, ja que aquest compost s'hauria generat via la prèvia formació de l'intermedi iminoquinònic **2**. La potencial toxicitat d'aquestes iminoquinones s'atribueix principalment al seu caràcter electrofílic. Tenint en compte aquest fet, s'han investigat les reaccions de **2** amb l'*N*-acetilcisteïna, l'ester metílic de l'*N*-acetilcisteïna i el glutatió. Els resultats van mostrar que la reacció entre la iminoquinona **2** i l'ester metílic de l'*N*-acetilcisteïna dona lloc al mono-adducte esperat com a producte majoritari, junt amb la formació dels corresponents bis- i tris-adductes. Aquest mono-adducte, però, una vegada aïllat, s'oxida espontàniament generant un altre intermedi iminoquinònic, el qual isomeritza i s'hidrolitza per donar lloc al tio-adducte formalment derivat de la iminoquinona del 4-aminofenol. El mateix fet s'observà en el cas de les reaccions de **2** amb l'*N*-acetilcisteïna i el glutatió. Els dos reactius tiòlics reaccionen amb la iminoquinona per donar lloc als corresponents adductes on l'addició es produeix en la posició *orto* respecte el grup amino. Aquests adductes també són inestables generant en un últim estadi els corresponents adductes formalment derivats del 4-aminofenol. La rellevància d'aquests fets, tant per a la SOT com per a una potencial generalització pel cas de iminoquinones derivades d'altres xenobiòtics, es discuteix a continuació.

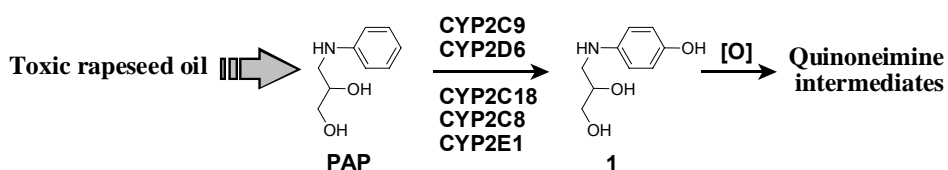


### 3.3. Publicació III

Anna Martínez-Cabot, Anna Morató, Jan N. M. Commandeur, Nico P. E. Vermeulen, and Angel Messeguer. *In vitro* bioactivation of 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol by human and rat liver microsomes and recombinant P450 enzymes. Implications for toxic oil syndrome (2007) *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1218-1224.

#### Resum

La síndrome de l'oli tòxic (SOT) fou una intoxicació alimentària que va tenir lloc a Espanya al 1981. Diferents estudis epidemiològics apunten als derivats del 3-(*N*-fenilamino)-1,2-propandiòl (PAP) com a possibles agents causants de la malaltia. En aquest treball s'ha estudiat la bioactivació *in vitro* del PAP en presència de microsomes hepàtics, tant de rata com humans. En tots dos casos, el 3-(4'-hidroxifenilamino)-1,2-propandiòl (**1**) es va identificar com el principal metabòlit. Els estudis d'inhibició amb microsomes de fetge humà, en presència i absència d'inhibidors específics d'alguns isoenzims del CYP450, suggereixen el 2C8 i el 2E1 com els principals enzims implicats en la bioactivació del PAP, seguits del 3A4/5, del 1A1/2 i del 2C9. Incubacions de PAP amb 10 isoenzims recombinants del CYP450 han mostrat que els enzims 2C8, 2C9, 2C18, 2D6 i 2E1 intervenen en la 4'-hidroxilació del PAP. Incubacions del fenol **1** amb microsomes hepàtics, tant de rata com humans, en presència de glutatió, donen lloc al conjugat del metabòlit iminoquinònic derivat d'**1**. En el cas de les incubacions amb microsomes de fetge de rata, els resultats suggereixen que els enzims P450 juguen un paper important en la bioactivació d'**1**, mentre que en el cas dels microsomes de fetge humà, l'autoxidació sembla ser el principal mecanisme. Finalment es discuteixen les implicacions d'aquests resultats per a la SOT.



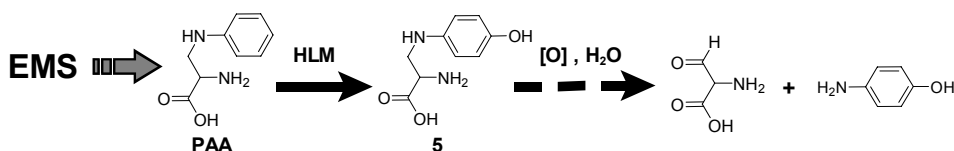


### 3.4. Publicació IV

Anna Martínez-Cabot, and Angel Messeguer. Generation of quinoneimine intermediates in the bioactivation of 3-(*N*-phenylamino)alanine (PAA) by human liver microsomes. A potential link between the eosiniphilia-myalgia syndrome and the toxic oil syndrome (2007) *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1556-1562.

#### Resum

La síndrome de l'eosinofília-miàlgia (SEM) és una intoxicació que va tenir lloc als EEUU al 1989 i que va afectar a més de 1500 persones. La SEM es va associar a la ingestió d'uns lots d'L-triptòfan manufacturat, i la 3-(*N*-fenilamino)alanina (PAA) va ser identificada com un dels contaminants presents en els lots responsables de la intoxicació. En estudis previs (vegeu Publicació III), es demostrava que la incubació del 3-(*N*-fenilamino)-1,2-propandiòl (PAP), biomarcador tòxic dels lots d'oli de colza que van causar la síndrome de l'oli tòxic (SOT) a Espanya, en presència de microsomes de fetge humà, donava lloc a la formació d'intermedis iminoquinònics. La similitud estructural entre el PAP i la PAA va portar a Mayeno i col·laboradors <sup>(53)</sup> a postular que els dos xenobiòtics podrien estar relacionats a través d'un agent etiològic comú. En aquest treball, s'han realitzat estudis sobre la bioactivació de la PAA en presència de microsomes de fetge humà. En aquestes condicions, la PAA dóna lloc al seu derivat 4'-hidroxilat, un intermedi inestable que es transforma ràpidament en el 4-aminofenol i la formilglicina com a metabòlits finals, els quals han estat detectats en les incubacions per CG-MS utilitzant H<sub>2</sub><sup>18</sup>O en el medi de incubació. També s'aporten evidències que el 4-aminofenol i la formilglicina es generen a partir d'un intermedi iminoquinònic seguint una ruta similar a la descrita en la bioactivació del PAP. Aquesta iminoquinona, en absència de nucleòfils en el medi de incubació, pot isomeritzar per donar lloc a la corresponent imina, la qual s'hidrolitzaria generant els productes finals mencionats anteriorment. Aquests resultats permeten establir un vincle de unió entre la SEM i la SOT, no només a través d'un metabòlit final comú com el 4-aminofenol, sinó també a través de la formació concomitant d'espècies carboníques de potencial toxicitat.

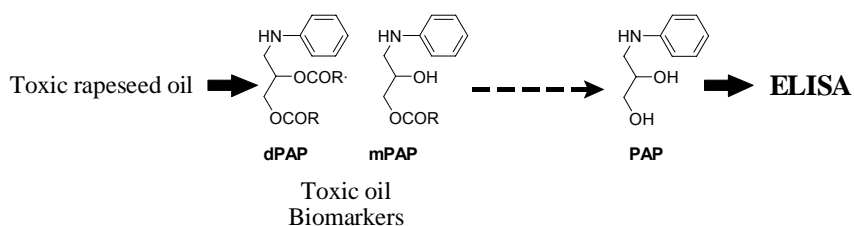


### 3.5. Publicació V

Anna Martínez-Cabot, Begoña Varela, Maia Lloveras, Rafael Campos, M-Pilar Marco and Angel Messeguer. Studies on toxic oil syndrome: development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 3- (N-phenylamino)propane-1,2-diol in human urine. (enviat a *Analytical and Bioanalytical Chemistry*).

#### Resum

Diferents estudis epidemiològics apunten als derivats esterificats del 3-(N-fenilamino)-1,2-propandiol (PAP) com a biomarcadors dels lots d'oli de colza que van causar la síndrome de l'oli tòxic (SOT), una intoxicació que va tenir lloc a Espanya al 1981, que va causar més de 400 morts i va afectar a més de 20000 persones. Els esters del PAP es transformen en PAP mitjançant l'acció de la lipasa pancreàtica humana. A més, la bioactivació *in vivo* del PAP en dues soques de ratolins dóna lloc a metabòlits potencialment tòxics. En aquest treball es presenta el desenvolupament d'un ELISA per a la detecció del PAP incorporant anticossos generats a partir de dos haptens derivats d'aquest compost. Els haptens **20** (àcid 4-[(N-(2',3'-dihidroxi)propil)-N-fenil]carbamoilbutanoic) i **21** (àcid 4-[(N-(2'-hidroxi-3'-(fenilamino)propil)-N-fenil]carbamoilbutanoic) s'han preparat mitjançant la reacció de l'anhidrid glutàric amb el PAP i el 1,3-bis-fenilamino-2-hidroxi-propà, respectivament. Els haptens utilitzats per a la immunització han estat dissenyats per reconèixer els residus fenilamino i hidroximetilè. Els antisèrums generats contra el **20-HCH** han mostrat una major afinitat per al PAP segons es mostra en els assaigs competitius utilitzant **20-BSA** o **21-BSA** com a antigens de recobriment. L'ELISA desenvolupat permet detectar PAP amb un límit de detecció de  $130 \mu\text{g L}^{-1}$  i treballar en un ampli interval de pH i de força iònica. L'assaig es pot aplicar a mostres d'orina humana, després d'un tractament de la mostra senzill, amb una bona exactitud segons la correlació obtinguda en analitzar mostres cegues en aquesta matriu biològica.



**Capítol 4**  
**RESULTATS I DISCUSSIÓ**



## **SUMARI CAPÍTOL 4**

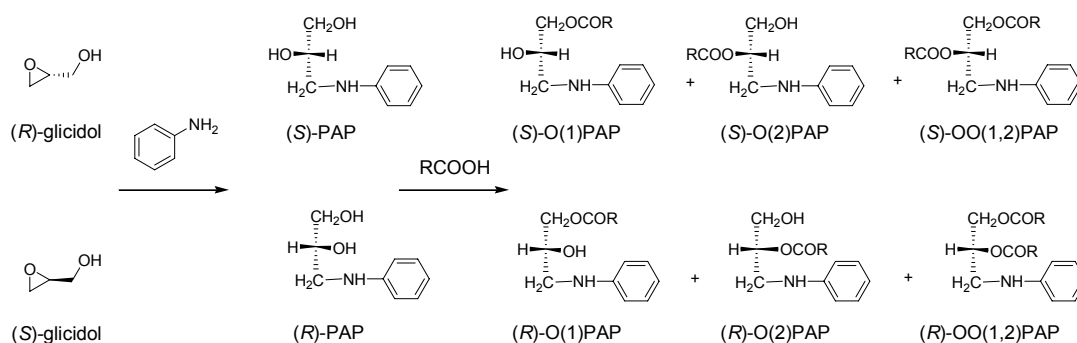
<b>4.1. HIDRÒLISI ESTEREOSELECTIVA DELS ESTERS DEL PAP PER PART DE LA LIPASA PANCREÀTICA HUMANA</b>	<b>157</b>
4.1.1. Obtenció dels estàndards	157
4.1.2. Assaigs amb lipasa pancreàtica humana	158
<b>4.2. ESTUDIS DE SÍNTESI I ESTABILITAT D'ADDUCTES DE GLUTATIÓ I N-ACETILCISTEÏNA FORMATS AMB L'INTERMEDI IMINOQUINÒNIC GENERAT A PARTIR DE LA BIOTRANSFORMACIÓ DEL PAP</b>	<b>163</b>
4.2.1. Reacció entre la iminoquinona <b>2</b> i l' <i>N</i> -AcCysOMe	163
4.2.2. Reacció entre la iminoquinona <b>2</b> i l' <i>N</i> -AcCys	166
4.2.3. Reacció entre la iminoquinona <b>2</b> i el GSH	169
<b>4.3. ESTUDI DE LA BIOACTIVACIÓ <i>IN VITRO</i> DEL PAP EN PRESENCIA DE MICROSOMES HEPÀTICS HUMANS I DE RATA I DE ISOENZIMS RECOMBINANTS DEL CYP450</b>	<b>174</b>
4.3.1. Identificació dels metabòlits del PAP en incubacions amb microsomes de fetge de rata i humà	174
4.3.2. Estudis de inhibició	175
4.3.3. Assaigs amb diferents isoenzims recombinants del P450	176
4.3.4. Estudi de la formació <i>in vitro</i> de l'adducte de glutatió <b>13</b>	178

4.3.5. Incubacions de P(1)PAP en presència de microsomes hepàtics humans	180
<b>4.4. GENERACIÓ D'INTERMEDIS IMINOQUINÒNICS EN LA BIOACTIVACIÓ DE LA PAA EN PRESÈNCIA DE MICROSOMES DE FETGE HUMÀ. ESTABLIMENT D'UN POTENCIAL VINCLE DE UNIÓ ENTRE LA SEM I LA SOT</b>	<b>183</b>
4.4.1. Detecció del gliceraldehid format a partir de l'evolució del conjugat d' <i>N</i> -acetilcisteïna <b>11</b>	183
4.4.2. Generació de la iminoquinona derivada de la PAA ( <b>17</b> )	184
4.4.3. Assajos <i>in vitro</i> amb la PAA en presència de microsomes de fetge humà	187
4.4.4. Detecció del 4-aminofenol en les incubacions de PAA en presència de microsomes de fetge humà	188
4.4.5. Detecció de la formilglicina per GC-MS utilitzant H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O en el medi de incubació	189
4.4.6. Formació del 4-aminofenol en incubacions amb fenol <b>16</b>	192
4.4.7. Detecció de la formació del conjugat <b>19</b>	193
<b>4.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP</b>	<b>197</b>
4.5.1. Síntesi dels haptens <b>20</b> i <b>21</b> i preparació dels immunoreactius	197
4.5.2. Desenvolupament d'un ELISA indirecte	198
4.5.3. Avaluació d'un immunoassaig pel PAP	198

## 4.1. HIDRÒLISI ESTEREOSELECTIVA DELS ESTERS DEL PAP PER PART DE LA LIPASA PANCREÀTICA HUMANA

### 4.1.1. Obtenció dels estàndards<sup>(\*)</sup>

La síntesi de cadascun dels enantiòmers dels oleats del PAP es va aconseguir mitjançant l'esterificació amb àcid oleic de l'(*R*)-PAP i l'(*S*)-PAP, els quals havien estat sintetitzats prèviament afegint anilina sobre (*S*)-glicidol i (*R*)-glicidol, respectivament (Figura 4.1.1).



**Figura 4.1.1.** Etapes per a la síntesi dels enantiòmers del PAP i dels seus corresponents derivats esterificats (RCOOH: àcid oleic).

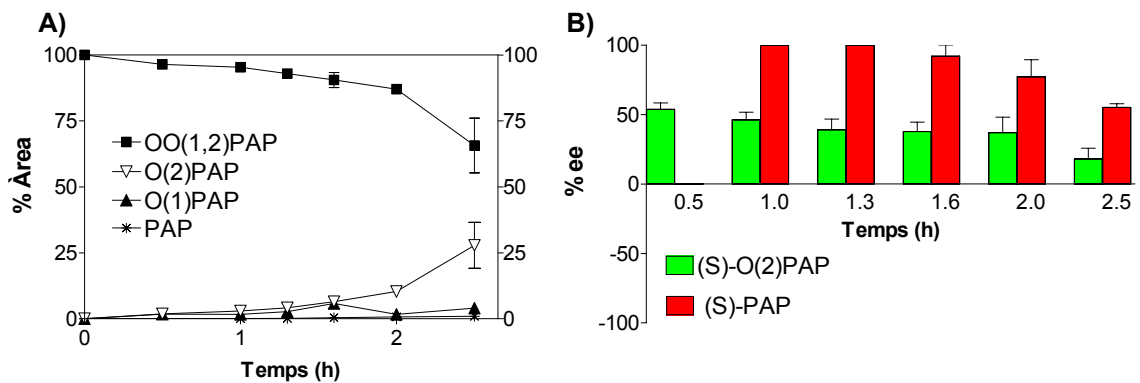
Durant els processos de purificació dels estàndards es va poder observar el fenomen de migració d'acil que tenia lloc entre l'O(2)PAP i l'O(1)PAP. Posteriors estudis d'estabilitat van indicar, com era de preveure, que la isomerització d'O(2)PAP a O(1)PAP estava afavorida per l'increment de polaritat del dissolvent. Així, tenint en compte la inestabilitat observada per l'O(2)PAP, i que les incubacions es realitzaven en medi aquós tamponat, varem creure convenient realitzar les incubacions d'aquest substrat un cop acabat de purificar.

<sup>(\*)</sup> Treball realitzat per la Dra. Anna Morató i el Dr. Jordi Escabrós.

### 4.1.2. Assaigs amb lipasa pancreàtica humana

Els estudis de hidròlisi estereoselectiva mitjançant l'hPL es van realitzar a partir dels estàndards racèmics, tot i disposar dels corresponents estàndards enantiomèrics. D'aquesta manera es podria comparar més fàcilment la resolució cinètica dels dos enantiòmers per part de l'hPL.

Els experiments es van iniciar, doncs, incubant el derivat racèmic diesterificat OO(1,2)PAP en presència de l'hPL. Durant aquests assaigs preliminars es van poder establir les concentracions òptimes d'àcid taurodesoxicòlic i colipasa porcina. Els resultats s'analitzaren per HPLC utilitzant una columna quiral i fent servir dos programes d'elució diferents per a cada mostra, la combinació dels quals permetria quantificar els excessos enantiomèrics (ee) dels productes formats. Així, es va poder observar que el OO(1,2)PAP era substrat de l'hPL segons la detecció dels corresponents productes de hidròlisi O(2)PAP, O(1)PAP i PAP. Els resultats suggerien, a més, una hidròlisi més ràpida en el cas de l'O(1)PAP que en el cas de l'OO(1,2)PAP (Vegeu Figura 4.1.2. A). Es va observar que aquesta hidròlisi per part de l'hPL era estereoselectiva. En concret, al cap de 30 min de incubació s'observà un ee del 54% per al cas de l'(S)-O(2)PAP, tal com mostra la Figura 4.1.2.B, suggerint certa preferència de l'hPL per l'enantiòmer (S)-OO(1,2)PAP.



**Figura 4.1.2.** Hidròlisi del OO(1,2)PAP amb el temps (A) i evolució de l'ee per l'(S)-O(2)PAP i l'(S)-PAP amb el temps (B) en presència de l'hPL (1.3 unitats /mL) a 37°C.



Els excessos enantiomèrics (ee) van ser determinats a partir de la següent fórmula:

$$\% ee_{(i)} = (\text{àrea pic}_{(i)} - \text{àrea pic}_{(j)}) \times 100 / (\text{àrea pic}_{(i)} + \text{àrea pic}_{(j)})$$

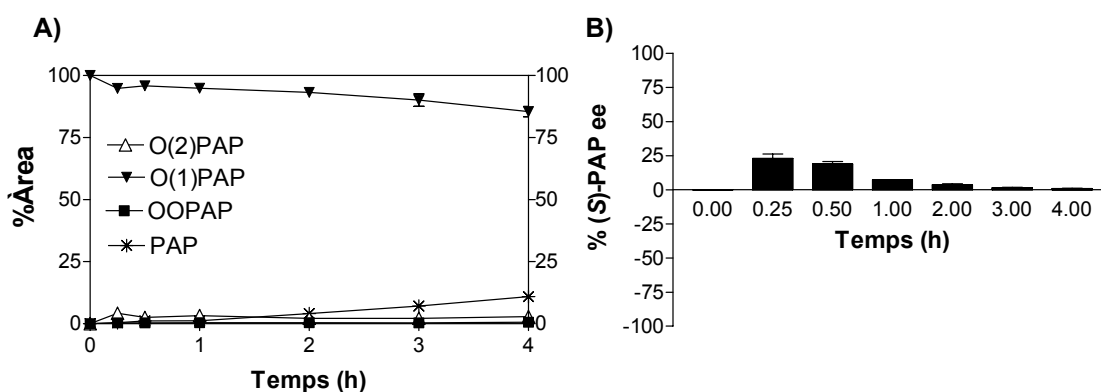
On:

(i)= enantiòmer majoritari

(j)= enantiòmer minoritari

A més, al cap d'1 h de incubació es detectava la formació d'(*S*)-PAP amb un 100% d'ee, suggerint així que el segon procés de hidròlisi (d'O(1)PAP a PAP) també era estereoselectiu (Figura 4.1.2. B).

Aquest últim fet va ser confirmat després de fer els mateixos experiments utilitzant l'O(1)PAP racèmic com a substrat. En aquest cas s'obtingué un ee màxim del 23% per a l'(*S*)-PAP al cap de 25 min de incubació. Aquests resultats també posaven en evidència la diferència en la velocitat de hidròlisi dels derivats diesterificats respecte els monoesterificats, sent més ràpida en el cas dels últims (Figura 4.1.3.).

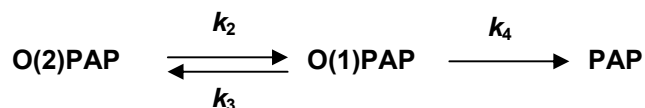


**Figura 4.1.3.** Hidròlisi de l'O(1)PAP amb el temps (A) i evolució de l'ee per l'(*S*)-PAP amb el temps (B) en presència de l'hPL (0.05 unitats /mL) a 37°C.

Per tal de confirmar aquest últim punt, es van realitzar incubacions d'OO(1,2)PAP i O(1)PAP amb hPL en les mateixes condicions, i es va comparar la desaparició d'ambdós substrats amb el temps. Els resultats indicaren una clara major velocitat de hidròlisi en el cas del derivat monoesterificat.

Així doncs, aquests estudis posaven de manifest que els derivats mono- i diesterificats del PAP eren substrats de l'hPL, generant preferencialment (S)-PAP com a producte final de hidròlisi. Mancava, però, determinar si l'etapa de migració d'acil (de l'O(2)PAP a l'O(1)PAP) estava també influenciada per l'activitat de l'hPL. Per tal de resoldre aquesta qüestió, es van fer incubacions d'O(2)PAP en presència i absència d'hPL. Els resultats van mostrar que en presència de l'enzim, l'O(2)PAP desapareixia per donar lloc a l'O(1)PAP, el qual era posteriorment hidrolitzat generant PAP com a producte final. En canvi, en les incubacions en absència d'enzim només s'observà, tal i com era d'esperar, la desaparició de l'O(2)PAP per formar O(1)PAP, la concentració del qual, en aquest cas, no decreixia, ja que no s'hidrolitzava. Cal esmentar que la velocitat de desaparició de l'O(2)PAP era lleugerament major en presència de l'hPL, però aquest fet es podria explicar per un desplaçament de l'equilibri degut a la progressiva desaparició de l'O(1)PAP per donar lloc a PAP. Per tant, semblava que la migració d'acil no era un procés catalitzat enzimàticament.

Per tal de confirmar aquests resultats, es va dur a terme un experiment addicional. Es van realitzar incubacions amb diferents concentracions de lipasa (4 i 8 unitats/ml) per establir quina era la dependència d'aquesta reacció de migració amb la quantitat d'enzim present a l'assaig. Assumint un model cinètic de reacció com el que es mostra a la Figura 4.1.4., es tractava d'ajustar aquest model a les dades experimentals, en aquest cas les concentracions relatives d'O(2)PAP, O(1)PAP i PAP, per tal de calcular les corresponents constants de velocitat aparents.



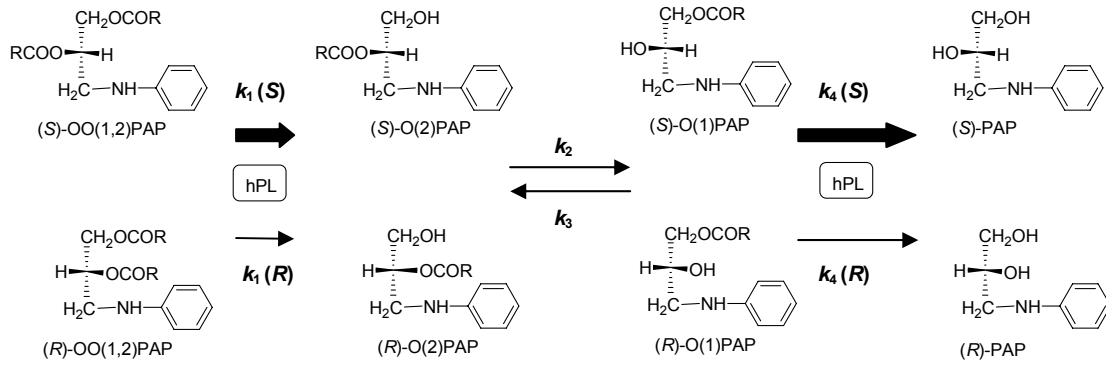
**Figura 4.1.4.** Model cinètic proposat per a les etapes de migració d'acil i hidròlisi del derivat monoesterificat del PAP, on  $k_2$ ,  $k_3$ , i  $k_4$  són les corresponents constants de velocitat aparents per a cada etapa.

Així, es va poder observar que el valor de  $k_4$  obtingut era aproximadament el doble quan es doblava també la concentració d'enzim emprat. En canvi, els valors de  $k_2$  i  $k_3$  tenien una variabilitat que es podria considerar dins de l'error experimental. Aquestes dades corroboraven que l'etapa de migració d'acil era independent de l'hPL, si bé s'haurien de prendre amb precaució, ja que els estudis es van fer sense considerar les diferències cinètiques entre els enantiòmers degut a la llarga durada de l'etapa d'anàlisi i a la ja esmentada inestabilitat de l'O(2)PAP.

Per últim, es van realitzar incubacions amb els derivats *N*-acilats del PAP, en concret l'OO(*N*,1)PAP i l'OOO(*N*,1,2)PAP, en presència d'hPL. Els resultats mostraren una comportament semblant al de l'O(2)PAP, ja que aquests *N*-acil derivats eren inestables en medi aquós i perdien el grup acil del nitrogen. Així, l'OO(*N*,1)PAP acabava donant O(1)PAP com a producte majoritari al cap de 30 min de incubació, tant en presència com en absència d'enzim. En el cas de l'OOO(*N*,1,2)PAP, sorprenentment també es detectava la formació d'O(1)PAP. És per això que, tot i que encara no s'ha trobat una explicació per a aquests fets, es considerarà que no tenia sentit continuar l'estudi d'aquests derivats *N*-acilats com a substrats de l'hPL, ja que els resultats suggerien que la ingestió d'aquests compostos presents en l'oli tòxic, acabarien donant lloc els corresponents derivats monoesterificats una vegada entressin al tracte intestinal.

Amb tot, els resultats obtinguts indicarien una hidròlisi per part de l'hPL dels derivats di- i monoesterificats del PAP amb una certa preferència pels enantiòmers *S*. Per tant, es podria donar la situació, una vegada aquests derivats fossin absorbits per l'intestí, que els productes majoritaris fossin: (*R*)-OO(1,2)PAP, (*S*)-

O(2)PAP, (R)-O(1)PAP i (S)-PAP, sent doncs aquests enantiòmers els que anirien a parar al fetge per tal de ser metabolitzats. A la Figura 4.1.5 es mostra un esquema de les etapes de hidròlisi de cadascun dels enantiòmers de l'OO(1,2)PAP.



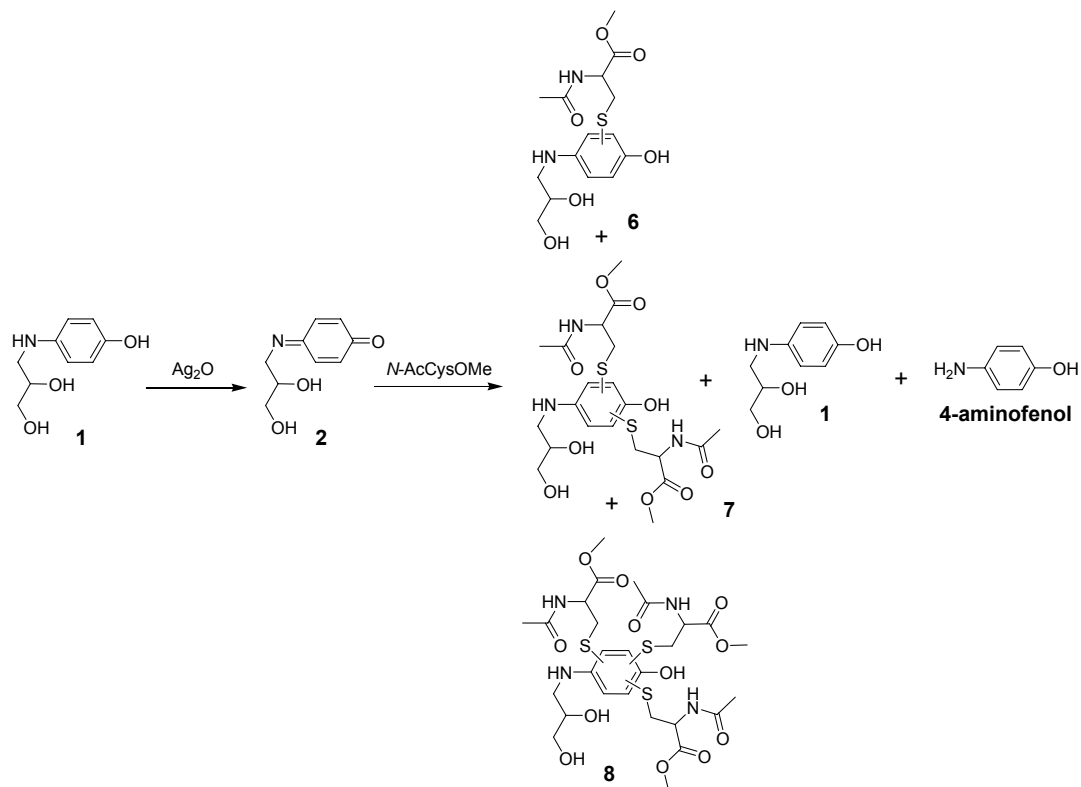
**Figura 4.1.5.** Etapes de hidròlisi i migració d'acil de cadascun dels enantiòmers de l'OO(1,2)PAP. Cada etapa està definida per una constant de velocitat on:  $k_1(S) \gg k_1(R)$ ,  $k_4(S) \gg k_4(R)$  i  $k_1(S,R) \ll k_4(S,R)$ .

## 4.2. ESTUDIS DE SÍNTESI I ESTABILITAT D'ADDUCTES DE GLUTATIÓ I *N*-ACETILCISTEÏNA FORMATS AMB L'INTERMEDI IMINOQUINÒNIC GENERAT A PARTIR DE LA BIOTRANSFORMACIÓ DEL PAP

### 4.2.1. Reacció entre la iminoquinona 2 i l'*N*-AcCysOMe

L'objectiu d'aquest treball era establir la reactivitat de la iminoquinona **2** amb tiols fisiològicament rellevants com ara l'*N*-AcCys o el GSH. Aquests estudis es van iniciar, però, utilitzant l'*N*-AcCysOMe com a tiol. Així, el fet que el residu àcid de l'*N*-AcCys estigués protegit facilitaria la seva manipulació i donaria lloc a crús més fàcils de tractar.

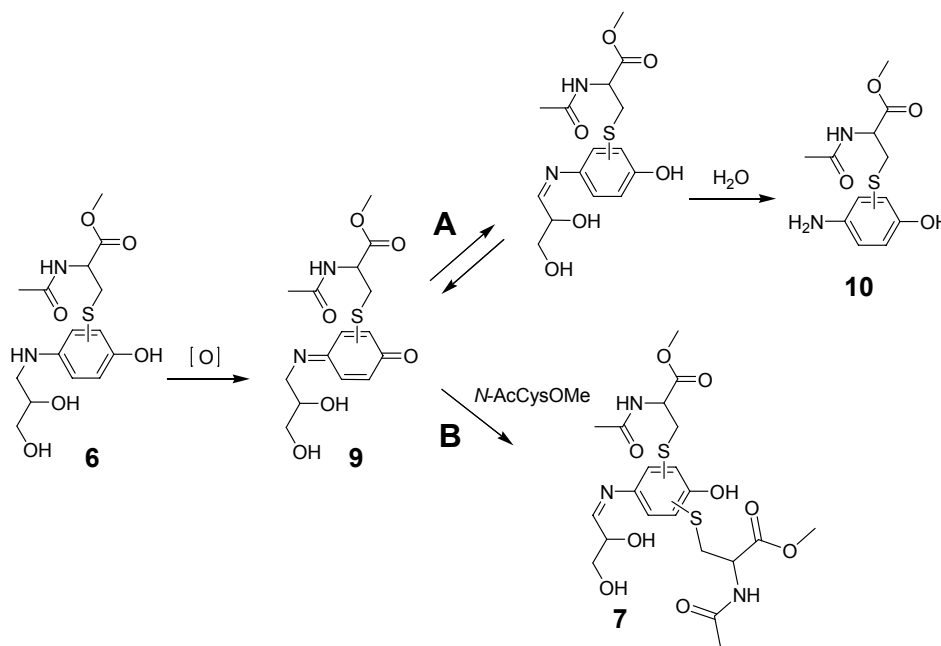
Com mostra la Figura 4.2.1., la iminoquinona **2** es generà a partir de l'oxidació del corresponent derivat fenòlic **1** amb òxid de plata. El cru obtingut es filtrà i s'afegí sobre una solució d'*N*-AcCysOMe. Al cap d'uns minuts s'observà la formació del mono-adducte **6**, però també s'observà la formació dels corresponents bis-adducte **7** i tris-adducte **8**. En el cru de reacció també es detectà 4-aminofenol i fenol de partida (**1**). Cal esmentar que totes aquestes reaccions es van dur a terme en condicions d'atmosfera inert i protegides de la llum.



**Figura 4.2.1.** Productes obtinguts a partir de la reacció entre l'*N*-AcCysOMe i la iminoquinona **2**, la qual és generada a través de l'oxidació del fenol **1** amb òxid de plata.

La formació del bis-adducte **7** podria explicar-se assumint que l'adducte **6** s'oxida per generar la corresponent iminoquinona **9**, la qual és capturada per una altra molècula de tiol per donar lloc al bis-adducte (vegeu Figura 4.2.2). Es podria seguir el mateix raonament per explicar la formació del tris-adducte **8** a partir de **7**. Per altra banda, la presència de 4-aminofenol al cru de reacció podria ser deguda a una isomerització de **2** cap a la corresponent base de Schiff seguida d'una hidròlisi. Quant a la detecció del fenol **1** al cru de reacció, si tenim en compte que la conversió d'aquest fenol a iminoquinona durant l'etapa d'oxidació té lloc de manera completa, la seva formació hauria d'explicar-se mitjançant una reducció de la iminoquinona **2**, on els agents reductors en aquest cas podrien ser el mateix tiol, o bé els adductes **6** i **7**.

La posterior purificació del cru de reacció va permetre l'aïllament dels adductes **6**, **7** i **8**, els quals van resultar ser químicament inestables. En concret, en el cas de l'adducte **6**, al cap de 4 h a 20 °C es va detectar la formació de dos nous productes majoritaris: la iminoquinona **9** derivada de l'oxidació de **6**, i el corresponent adducte del 4-aminofenol **10**. Degut a l'absència d'agents reductors en el medi, una vegada l'adducte **6** era aïllat, aquesta nova iminoquinona formada isomeritzava a la corresponent imina, la qual era posteriorment hidrolitzada per donar lloc a l'adducte **10** (vegeu Figura 4.2.2.).



**Figura 4.2.2.** Etapes proposades per a la transformació de l'adducte **6** segons: **(A)** absència d'agent reductor **(B)** presència de *N*-AcCysOMe.

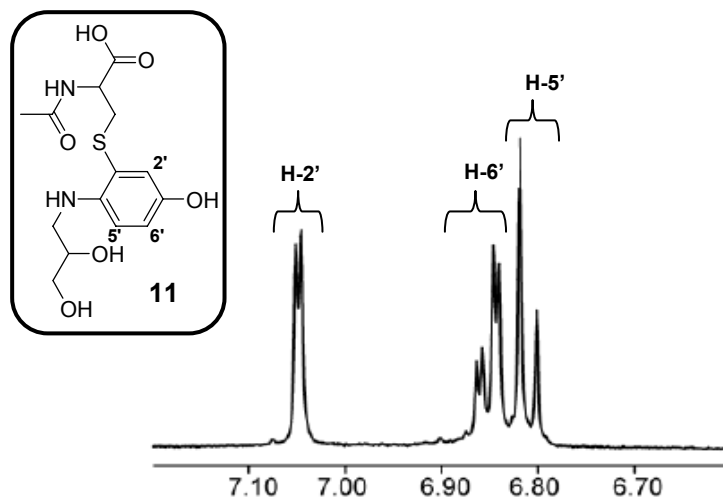
La inestabilitat mostrada per aquests adductes va impedir la seva completa caracterització. Només en el cas del tris-adducte **8** va ser possible realitzar estudis d' $^1H$ -RMN, de manera que es va poder detectar la presència d'un sol protó aromàtic, indicant l'addició de tres residus d' *N*-AcCysOMe sobre l'anell.

#### 4.2.2. Reacció entre la iminoquinona 2 i l'*N*-AcCys

En les mateixes condicions que en el cas anterior es va dur a terme la reacció entre la iminoquinona 2 i l'*N*-AcCys. En aquest cas el mono-adducte 11 fou el producte majoritari, ja que el corresponent bis-adducte va ser detectat en molta menys quantitat. Aquest fet suggeria que l'*N*-AcCys era més eficient com a antioxidant que el corresponent ester metílic. Per altra banda, el fenol 1 i el 4-aminofenol també varen ser detectats en el cru de reacció.

L'espectre d'<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) de l'adducte 11 va permetre determinar la regioquímica de l'addició del tiol sobre la iminoquinona. En concret, l'anàlisi de la zona aromàtica de l'espectre (7.06-6.81 ppm) revelava la presència de 3 protons aromàtics (vegeu Figura 4.2.3), indicant la formació del mono-adducte. D'aquests tres senyals, dos es manifestaven en forma de doblet (a 7.05 i a 6.81 ppm) i l'altre com a doblet de doblets (a 6.85 ppm). Segons el llibre de taules de Pretsch i col·laboradors<sup>(59)</sup>, aquest darrer hauria de correspondre al protó que estigués en posició *para* respecte el grup tioèter, en ser l'únic que es podria acoblar amb dos protons aromàtics, un en *orto* ( $J= 8.5$ ) i l'altre en *meta* ( $J= 2.5$ ), donant lloc a aquest doblet de doblets. Segons els valors obtinguts a partir de la llei empírica de l'efecte dels substituents en el desplaçament químic dels protons aromàtics del benzè, es proposà l'addició del tiol en la posició 3 de l'anell aromàtic (Figura. 4.2.3.). Aquests valors empírics suggerien un acoblament en *meta* ( $J= 2.5$ ) en el cas del doblet corresponent al protó de desplaçament químic més alt (H-2', 7.04 ppm), i un acoblament en *orto* ( $J= 8.5$ ) en el cas de l'altre doblet (H-5', 6.81 ppm).





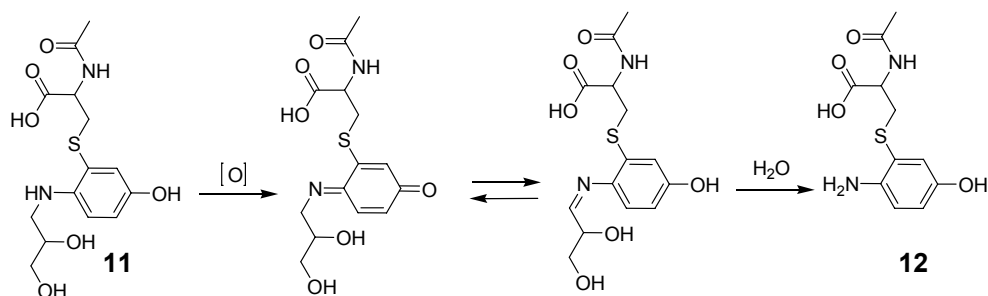
**Figura 4.2.3.** Perfil de la zona aromàtica de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de l'àcid mercaptúric **11** i estructura proposada per a aquest compost.

Segons els càlculs realitzats, si l'addició hagués tingut lloc en la posició 2 de l'anell, l'espectre hauria d'haver mostrat el doblet de  $J = 8.5$  amb un desplaçament químic superior al del doblet de  $J = 2.5$ . Aquests resultats suggerien, doncs, que l'addició de l'*N*-AcCys tenia lloc en *orto* respecte el grup amino, fet que coincidia amb el descrit prèviament a la bibliografia respecte els adductes de GSH del 4-aminofenol<sup>(60)</sup>.

La presència de 4-aminofenol i fenol **1** al cru de reacció, junt amb el fet de no detectar-hi el dímer de l'*N*-AcCys, donarien pes a la hipòtesi que adductes com **11** puguin actuar com a agents reductors regenerant **1** a partir de la iminoquinona **2**.

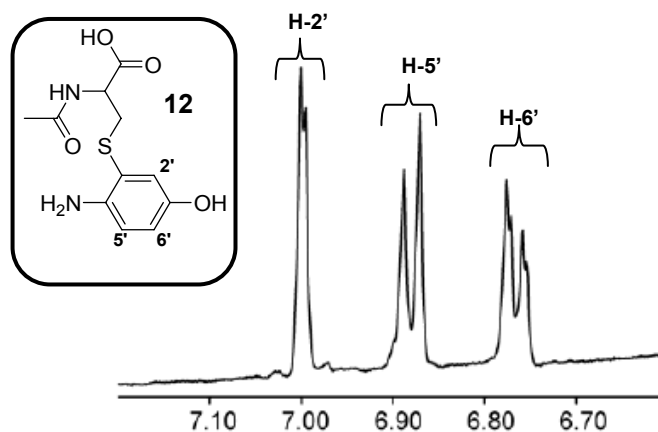
D'altra banda, tot indicava que aquest mono-adducte **11** també seria inestable, de la mateixa manera que ho eren els corresponents adductes amb l'*N*-AcCysOMe. I efectivament, es va poder veure com al cap de 6 h a 20 °C aproximadament un 50 % del compost **11** pur es transformava en d'altres productes, un dels quals va ser identificat com l'àcid mercaptúric del 4-aminofenol

(12). Per tant, semblava que també en aquest cas l'adducte, una vegada aïllat, s'oxidava a iminoquinona, isomeritzava i posteriorment s'hidrolitzava per donar lloc al corresponent adducte del 4-aminofenol (vegeu Figura 4.2.4.).



**Figura 4.2.4.** Etapes proposades per a la transformació de l'adducte **11** en **12**.

Per tal de confirmar la formació i estructura de **12**, es va sintetitzar aquest àcid mercaptúric en les mateixes condicions que en el cas anterior, però partint de 4-aminofenol comercial enlloc de fenol **1**. En aquest cas, a més del mono-adducte esperat **12**, també es va observar la formació dels corresponents bis- i tris-adducte, tot i que en menor quantitat. Com en el cas anterior, l'anàlisi de la zona aromàtica de l'espectre (7.03-6.75 ppm) segons els valors obtinguts a partir de la llei empírica de l'efecte dels substituents en el desplaçament químic dels protons aromàtics del benzè<sup>(59)</sup>, va permetre l'assignació de cadascun dels senyals als corresponents protons aromàtics. En aquest cas, el doblet centrat a 7.02 ppm ( $J=2$  Hz, acoblament en *meta*) s'atribuï a l'H-2', el doblet centrat a 6.90 ppm ( $J=8.5$  Hz, acoblament en *orto*) s'assignà a l'H-5', i el doblet de doblets centrat a 6.79 ppm ( $J_1=8.5$  Hz,  $J_2=2$  Hz, acoblaments en *orto* i en *meta*, respectivament) s'atribuï a l'H-6' (vegeu Figura 4.2.5.). Per tant, es confirmava l'addició del tiol sobre la iminoquinona, en aquest cas la derivada del 4-aminofenol, en la posició 3 de l'anell aromàtic (Figura 4.2.5.).



**Figura 4.2.5.** Perfil de la zona aromàtica de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de l'àcid mercaptúric **12** i estructura proposada per a aquest compost.

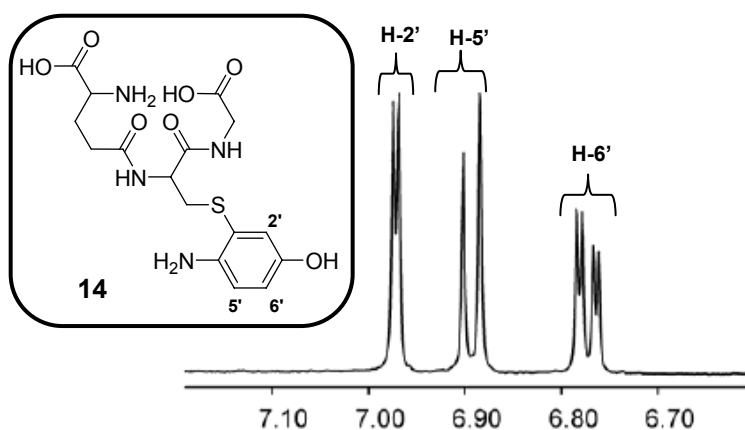
#### 4.2.3. Reacció entre la iminoquinona **2** i el GSH

Degut a la baixa solubilitat del GSH en metanol, dissolvent emprat en les reaccions anteriors, es van haver de canviar les condicions per tal de generar la iminoquinona **2** a un medi aquós on el GSH fos soluble. Es va seguir el procediment descrit per Klos i col·laboradors utilitzant HRP i  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a oxidants<sup>(67)</sup>. L'anàlisi del cru de reacció va permetre detectar la formació de l'adducte esperat **13**. Malauradament, la inestabilitat d'aquest adducte de glutatió va impedir la seva completa caracterització.

Per avaluar aquesta inestabilitat, es van realitzar incubacions de l'adducte **13** en les mateixes condicions que l'àcid mercaptúric **11**. Es va poder veure que al cap de 3 h a 37 °C, aproximadament un 50% de **13** s'havia transformat en el corresponent adducte del 4-aminofenol **14**. Segons aquests resultats, semblava que l'adducte de glutatió **13** era més inestable que **11**.

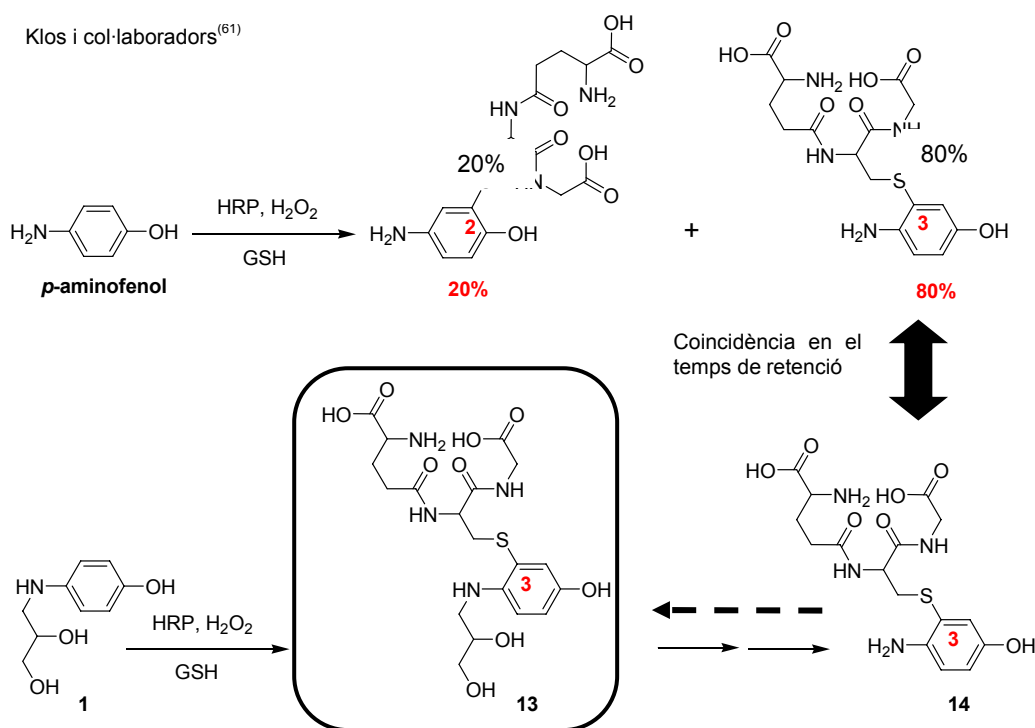
Seguidament, es va dur a terme la síntesi de l'adducte del 4-aminofenol **14**. Les condicions de reacció foren les mateixes que les emprades per l'obtenció de **13**, però partint de 4-aminofenol comercial enlloc de fenol **1**. Els resultats, però, van ser una mica diferents que en els casos anteriors, ja que s'obtingué una mescla 1:4 d'isòmers de l'adducte **14** corresponents a l'addició del GSH sobre el C-2 i sobre el C-3, respectivament. Segons la bibliografia, l'isòmer en major proporció corresponia a l'addició del GSH en *orto* respecte el grup amino<sup>(67)</sup>.

Per tal de confirmar aquesta assignació, es va purificar l'isòmer majoritari i es va analitzar per <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O). Com en els casos anteriors, l'estudi de la zona aromàtica de l'espectre (6.90-6.75 ppm) segons els valors obtinguts a partir de la llei empírica de l'efecte dels substituents en el desplaçament químic dels protons aromàtics del benzè<sup>(59)</sup>, va permetre l'assignació de cadascun dels senyals als corresponents protons aromàtics. En concret, el doblet centrat a 6,97 ppm ( $J= 2.5$  Hz) fou atribuït a l'H-2', l'altre doblet centrat a 6.89 ppm ( $J= 9$  Hz) fou assignat a l'H-5', i el doblet de doblets centrat a 6.77 ppm ( $J_1= 2.5$  Hz,  $J_2= 9$  Hz) fou atribuït a l'H-6' (vegeu Figura 4.2.6.). Per tant, aquests resultats confirmaven que l'isòmer majoritari de l'adducte **14** corresponia a l'addició del GSH sobre el C-3 del 4-aminofenol (Figura 4.2.6.).



**Figura 4.2.6.** Perfil de la zona aromàtica de l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) de l'adducte de GSH **14** i estructura proposada per a aquest compost.

Tot i que, com s'ha esmentat anteriorment, no va ser possible establir la regioquímica de l'adducte **13** degut a la seva inestabilitat, el fet que l'isòmer majoritari de **14** obtingut sintèticament i l'adducte **14** obtingut a partir de la transformació de **13** coincidissin en el temps de retenció en les mateixes condicions d'HPLC, indicava que es tractava del mateix regioisòmer, es a dir, el corresponent a l'addició del GSH sobre C-3. Aquest fet suggeria, per tant, que l'addició del GSH sobre la iminoquinona **2** s'havia produït també en la posició 3 de l'anell aromàtic (vegeu Figura 4.2.7.).



**Figura 4.2.7.** Estructures proposades a partir de dades experimentals i obtingudes de la literatura<sup>(61)</sup> per als mono-adductes de glutatió obtinguts *in vitro* a partir del fenol **1** i el 4-aminofenol.

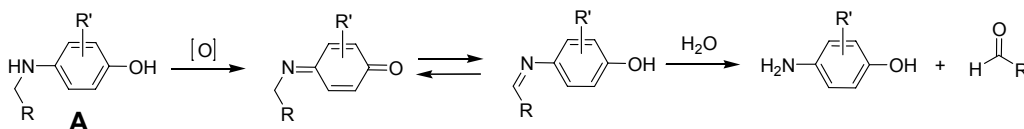
En definitiva, tots aquests experiments van mostrar que la iminoquinona **2** es podia generar a partir de l'oxidació del fenol **1**. A més, aquesta iminoquinona

podia ser capturada per compostos amb un grup tiol lliure, com és el cas de l'*N*-AcCysOMe, l'*N*-AcCys o el GSH, donant lloc als corresponents adductes de Michael. Val a dir que en tots els casos sembla que l'addició del tiol sobre la iminoquinona té lloc en la posició 3 de l'anell aromàtic. Aquests adductes, però, no són estables i poden tornar-se a oxidar generant intermedis iminoquinònics que poden tornar a ser capturats per una altra molècula de tiol, donant lloc a bis-adductes o tris-adductes. En canvi, en absència d'agents reductors com són aquests tiols, l'intermedi iminoquinònic format estableix un equilibri amb la corresponent base de Schiff, la qual s'hidrolitza per donar lloc finalment a l'adducte derivat del 4-aminofenol.

La prèvia identificació de 4-aminofenol en mostres d'orina de rates tractades intraperitonealment amb PAP ( $^{14}\text{C}$ )<sup>(11,12)</sup>, suggereix que adductes com **12** o **14** també podrien estar presents en aquestes mostres biològiques obtingudes a partir d'assaigs *in vivo*. La seva detecció posaria de manifest la possible generació d'espècies iminoquinòniques potencialment tòxiques a partir de la bioactivació dels derivats del PAP. Aquestes iminoquinones són altament electròfiles i poden enllaçar-se covalentment a nucleòfils com el GSH o l'*N*-AcCys, tal com es mostra en aquest treball, però també a d'altres macromolècules o components cel·lulars produint efectes tòxics<sup>(42)</sup>. En aquest context, Li i col·laboradors han descrit recentment l'enllaç de quinones a llocs específics de proteïnes mitjançant l'addició de grups tiol i reaccions d'addició-eliminació<sup>(62)</sup>. L'extensió d'aquesta toxicitat potencial al cas de la iminoquinona **2**, podria ajudar a avaluar els mecanismes de toxicitat d'aquestes espècies involucrades en la SOT.

Amb tot, podem extrapolar la inestabilitat dels adductes estudiats en aquest treball a d'altres exemples de metabolisme de xenobiòtics de fase II. En concret, aquest podria ser un comportament general en el cas de iminoquinones formades a partir d'aminofenols amb una estructura com la que es mostra a la Figura 4.2.8. (compost **A**). La presència dels àtoms de hidrogen del carboni adjacent al grup amino farien possible que s'establís l'equilibri entre la iminoquinona i la base de Schiff. Seguidament, la hidròlisi d'aquesta imina donaria lloc a dos productes:

l'adducte derivat del 4-aminofenol i el corresponent aldehyd, que en el cas de la iminoquinona **2** seria el gliceraldehyd.



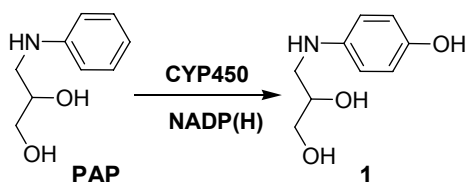
**Figura 4.2.8.** Etapes proposades per a la transformació d'aminofenols tipus **A** en adductes del 4-aminofenol, donant lloc també a compostos carbonílics.

Per tant, caldria tenir en compte la via descrita a la Figura 4.2.8. tant per xenobiòtics amb una estructura tipus **A**, com per xenobiòtics la bioactivació dels quals pugui donar lloc a aminofenols tipus **A**. Aquest és el cas de la 3-(*N*-fenilamino)alanina (PAA), un del contaminants detectats en els lots d'L-triptòfan responsables de la Síndrome de l'Eosinofília-Miàlgia (SEM), malaltia que tingué lloc el 1989 als Estats Units i que afectà a 1500 persones. Fins a dia d'avui s'han establert diversos vincles de unió entre la SEM i la SOT<sup>(51,53)</sup>, i un d'addicional podria ser la bioactivació de la PAA per part dels enzims P450 donant lloc a un aminofenol tipus **A** capaç de seguir la via descrita a la Figura 4.2.8. Aquesta hipòtesi es discuteix amb més profunditat en el capítol 4.4 d'aquesta memòria.

### 4.3. ESTUDI DE LA BIOACTIVACIÓ *IN VITRO* DEL PAP EN PRESENCIA DE MICROSOMES HEPÀTICS HUMANS I DE RATA I DE ISOFORMES RECOMBINANTS DEL CYP450

#### 4.3.1. Identificació dels metabòlits del PAP en incubacions amb microsomes de fetge de rata i humà

Per tal d'estudiar quin era el paper dels enzims P450 en la bioactivació oxidativa del PAP, es van dur a terme incubacions d'aquest substrat amb RLM i HLM en presència d'NADP(H). En aquestes condicions, l'únic metabòlit detectat en ambdós casos fou el derivat fenòlic del PAP **1**, el qual era generat a partir de la hidroxilació en la posició *para* de l'anell aromàtic del PAP (vegeu Figura 4.3.1.). L'estructura d'**1** va ser confirmada per ESI-HRMS i per comparació amb l'estàndard corresponent.



**Figura 4.3.1.** Estructura del metabòlit detectat (**1**) després d'incubar PAP (5 mM) amb RLM i HLM i en presència d'NADP(H) durant 20 min a 37 °C.

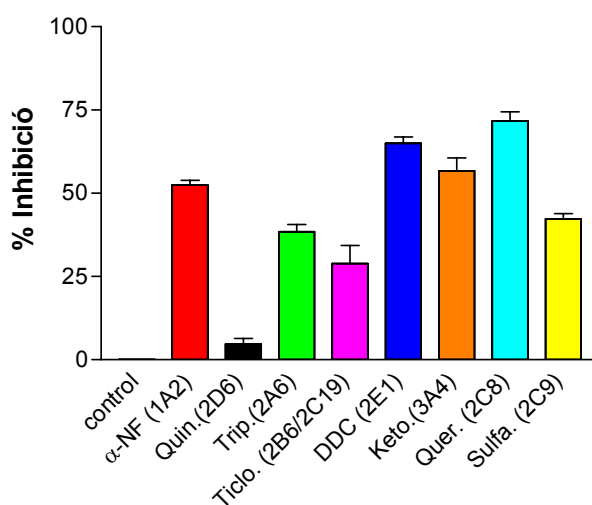
A continuació, es van realitzar els estudis cinètics per tal d'avaluar l'eficàcia d'aquests enzims involucrats en la bioactivació del PAP. Els resultats van mostrar, tant pels microsomes de fetge de rata com pels humans, uns valors de  $K_m$  de l'ordre de mil·limolar ( $K_m$  (RLM):  $2.2 \pm 0.4$  mM i  $K_m$  (HLM):  $1.7 \pm 0.3$  mM). El valor de la  $k_{cat}$  per al cas dels microsomes de fetge de rata ( $5.0 \pm 0.5$  nmol min<sup>-1</sup> (mg prot<sup>-1</sup>)) resultà ser lleugerament més alt que per al cas dels microsomes de fetge humà ( $1.7 \pm 0.3$  nmol min<sup>-1</sup> (mg prot<sup>-1</sup>)). Per tant, el paràmetre  $k_{cat}/K_m$  suggeria una major eficàcia dels enzims de rata ( $k_{cat}/K_m$  (RLM):  $2.3 \pm 1.2$  nmol min<sup>-1</sup>



<sup>1</sup> (mg prot<sup>-1</sup>) mM<sup>-1</sup>) respecte els humans ( $k_{cat}/K_m$  (HLM):  $1 \pm 0.4$  nmol min<sup>-1</sup> (mg prot<sup>-1</sup>) mM<sup>-1</sup>).

#### 4.3.2. Estudis de inhibició

Posteriorment es van dur a terme incubacions de PAP amb HLM en presència d'inhibidors específics de diferents isoenzims del P450. Aquest experiment tenia com a objectiu identificar quins eren els enzims involucrats en la 4'-hidroxilació del PAP. Per tal d'establir quin seria el 100 % d'activitat (o 0% de inhibició), es realitzaren també incubacions en absència d'inhibidor.



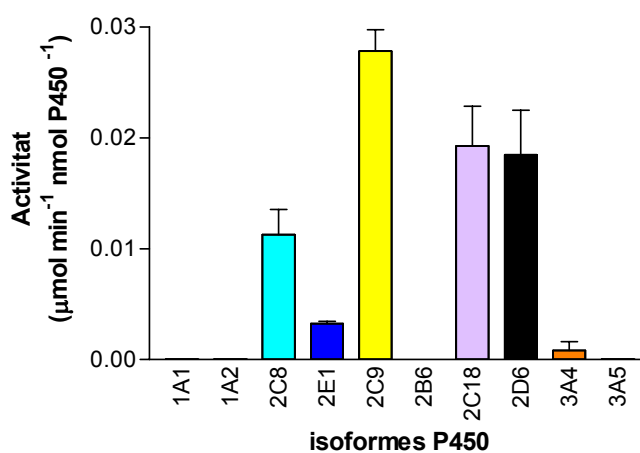
**Figura 4.3.2.** Inhibició de diferents isoenzims del P450 en la 4'-hidroxilació del PAP en presència d'HLM i dels seus inhibidors específics. La mostra *control* representa el 0% de inhibició (incubació en absència d'inhibidor). Als peus de cada columna s'indica l'inhibidor emprat i entre parèntesis l'isoenzim al qual inhibeix, on α-NF: α-naftoflavona; Quin.: quinidina; Trip.: triptamina; Ticlo.: ticlopidina; DDC: dietilditiocarbamat; Keto.: ketoconazole; Quer.: quercetina, Sulfa.: sulfafenazole.

Tal com es mostra a la Figura 4.3.2., els resultats van senyalar els enzims 2C8 (72% de inhibició) i 2E1 (65% de inhibició) com els més actius en la bioactivació del PAP, en ser els enzims més inhibits en presència dels seus

inhibidors específics (quercetina i dietilditiocarbamat, respectivament). Aquests resultats també suggerien una implicació important per part d'aquests enzims en la 4'-hidroxilació del PAP. S'observà una certa disminució de l'activitat en presència dels seus inhibidors específics per als enzims 3A4/5, 1A1/2, 2C9 i 2B6/2C19, amb uns valors de inhibició del 57%, 53%, 39% i 29% respectivament. Semblava que diferents enzims podien intervenir en la bioactivació del PAP. Per altra banda, l'enzim 2D6 no va mostrar pràcticament inhibició (5%).

### 4.3.3. Assaigs amb diferents isoenzims recombinants del P450

Per complementar els resultats obtinguts en els estudis de inhibició, es van dur a terme incubacions del PAP amb diferents enzims recombinants del P450 en presència d'NADP(H). En aquest cas, els resultats van mostrar els isoenzims 2C9, 2C18, 2D6, 2C8 i 2E1 com els més actius en la generació del fenol **1**, tal com es mostra a la Figura 4.3.3.



**Figura 4.3.3.** Activitat de diferents isoenzims recombinants del P450 en la 4'-hidroxilació del PAP (5 mM) al cap de 20 min a 37 °C.

La determinació posterior dels paràmetres cinètics per a aquests enzims implicats va permetre observar uns valors de  $K_m$  de l'ordre de mil·limolar, igual que

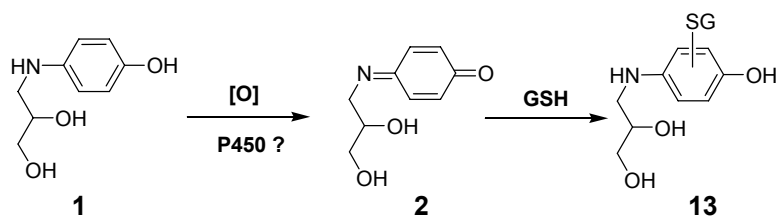
en el cas de les incubacions amb microsomes. En concret, l'isoenzim que mostrà un valor de  $K_m$  més baix fou el 2C8 ( $K_m = 1.0 \pm 0.2$  mM). Els valors de  $k_{cat}$  dels enzims 2C9, 2C18 i 2D6 foren similars ( $138 \pm 20$ ,  $118 \pm 18$  i  $144 \pm 8$  min<sup>-1</sup>, respectivament). Per als enzims 2C8 i 2E1, els valors de  $k_{cat}$  van ser lleugerament inferiors ( $20 \pm 1$  i  $19 \pm 3$  min<sup>-1</sup>, respectivament). Com a conseqüència, els valors del paràmetre indicador de l'eficàcia de l'enzim  $k_{cat}/K_m$  eren comparables per als enzims 2C8, 2C9, 2C18 i 2D6 ( $19 \pm 1$ ,  $24 \pm 20$ ,  $18 \pm 10$ , i  $29 \pm 11$  min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, respectivament). En canvi, en el cas de l'isoenzim 2E1, aquest paràmetre mostrà un valor 5-6 vegades menor ( $k_{cat}/K_m = 4 \pm 2$ ).

En comparar els resultats obtinguts a partir de les incubacions amb isoenzims recombinants amb els obtinguts en els estudis de inhibició, podem observar que alguns són consistents (la implicació dels enzims 2C8, 2C9 i 2E1), però d'altres semblen contradictoris. Aquest és el cas de l'isoenzim 2D6, el qual mostrà certa activitat en la 4'-hidroxilació del PAP, però molt poca inhibició (5%) quan es feren incubacions d'HLM en presència d'un dels seus inhibidors específics. L'explicació per aquest fet es podria trobar en el baix contingut de l'enzim 2D6 en els HLM (2% del P450 total<sup>(63)</sup>). Per altra banda, l'enzim 3A4 mostrà molt poca activitat en la bioactivació del PAP, mentre que la presència de ketoconazole (inhibidor dels enzims 3A4/5) en les incubacions d'HLM produïa més d'un 50% de inhibició en la 4'-hidroxilació del PAP. En aquest cas, l'alt contingut de l'enzim 3A4 en els HLM (30% del P450 total<sup>(63,38)</sup>) podria haver compensat la baixa activitat d'aquest enzim en la bioactivació el PAP. Per últim, l'activitat dels HLM va ser inhibida en presència de l' $\alpha$ -naftoflavona, compost acceptat per l'FDA com a inhibidor selectiu dels isoenzims 1A1/2<sup>(64)</sup>. Aquest fet suggereix una activitat per part d'aquests enzims; en canvi, incubacions tant amb l'enzim 1A1 com amb el 1A2 no van mostrar activitat en la 4'-hidroxilació del PAP. Aquest fet podria ser degut a que l' $\alpha$ -naftoflavona no actua exclusivament en relació als enzims 1A1/2, ja que segons Chang i col·laboradors l' $\alpha$ -naftoflavona també és capaç d'inhibir els enzims recombinants 2C8 i 2C9 en el mateix grau que ho fa en els enzims 1A1/2, i a unes concentracions d'inhibidor de l'ordre de les emprades en l'assaig<sup>(65)</sup>. Per tant, podria ser que la disminució en l'activitat dels HLM en presència de l' $\alpha$ -naftoflavona fos deguda a la inhibició dels isoenzims 2C8 i 2C9, els quals sí que

havien mostrat activitat. També hi ha un altre inhibidor utilitzat en aquests estudis, la DDC, el qual també ha mostrat ser poc selectiu, inhibint a més de l'isoenzim 2E1 als enzims 2A6, 2B6 i 2C8<sup>(65)</sup>. Tot i així, el fet que l'isoenzim recombinant 2E1 mostrés activitat en la 4'hidroxilació del PAP dóna suport a la participació d'aquest enzim en el metabolisme oxidatiu del PAP.

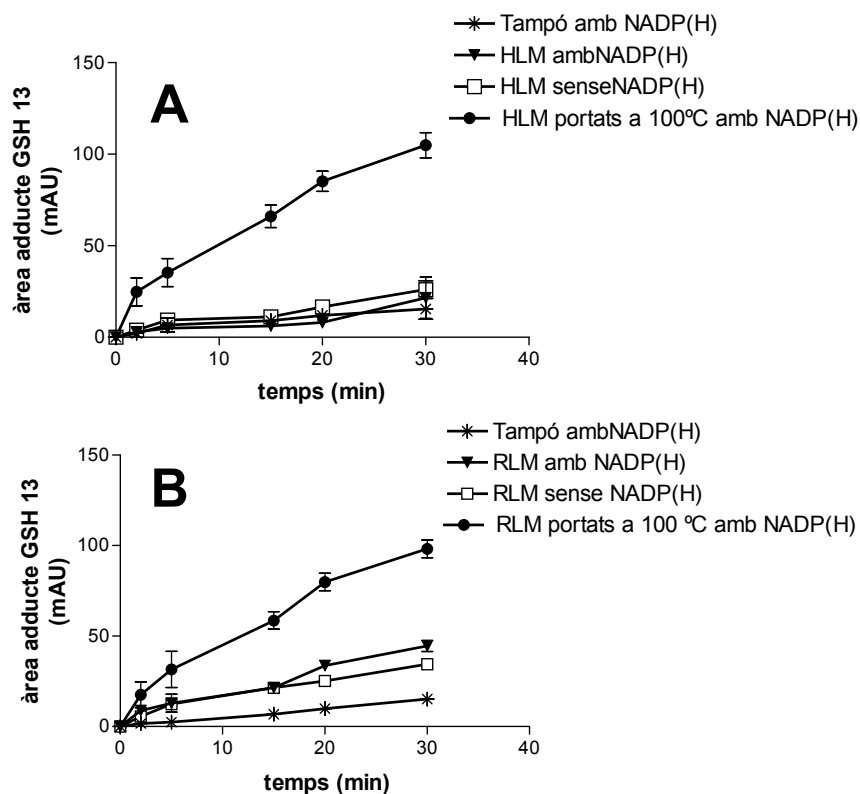
#### 4.3.4. Estudi de la formació *in vitro* de l'adducte de glutatió **13**

Tal com s'explica en l'apartat 4.2.1. d'aquesta memòria, el metabòlit del PAP **1** pot oxidar-se novament generant la iminoquinona **2**. Aquest intermedi podria seguir la ruta descrita a la Figura 4.2.8. donant lloc finalment al 4-aminofenol i al gliceraldehid, podria ser atrapat per tiols com el glutatió o l'*N*-acetilcisteïna donant lloc als corresponents conjugats, o bé podria enllaçar-se covalentment a proteïnes degut a l'elevada electrofília que presenten aquestes espècies iminoquinòniques<sup>(42,66,67)</sup>, amb les conseqüències toxicològiques que aquest fet podria tenir. Per aquest motiu, ens plantejarem estudiar la implicació dels enzims P450 en l'oxidació d'**1** a **2**. Malauradament, aquesta iminoquinona és tan reactiva que no va poder ser aïllada<sup>(68)</sup>. Aquest fet dificultava, doncs, la determinació dels paràmetres cinètics de la reacció. Com a alternativa, es decidí estudiar la formació de **2** d'una manera indirecta, a través de la formació del corresponent adducte de glutatió **13**, tal com s'indica a la Figura 4.3.4.



**Figura 4.3.4.** Etapes proposades per a la formació de l'adducte **13** a partir del fenol **1**.

Es van realitzar incubacions del fenol **1** amb microsomes hepàtics, tant de rata com humans, i glutatió en presència i absència d'NADP(H). Per veure el grau d'autoxidació implicat en la formació del fenol **1** es van realitzar incubacions en absència de microsomes i en presència de microsomes prèviament portats a 100 °C. En tots els casos l'anàlisi de les mostres per HPLC va mostrar la formació d'un pic que va ser identificat com l'adducte **13**, mitjançant ESI-HRMS i la comparació amb el corresponent estàndard sintetitzat independentment. En el cas de les incubacions amb HLM, no es van observar diferències en la velocitat de formació de l'adducte **13** entre els experiments en presència i absència d'NADP(H) i en presència i absència de microsomes (vegeu Figura 4.3.5. A). Curiosament, es va detectar un notable increment en la formació de l'adducte **13** en presència dels microsomes prèviament portats a 100 °C (Figura 4.3.5. A). Aquests resultats suggerien que l'oxidació del fenol **1** a iminoquinona no era una reacció depenent d'enzim. En canvi, en el cas de les incubacions amb RLM s'observà una lleugera diferència en la velocitat de formació de **13** entre els assaigs realitzats en presència de microsomes i d'NADP(H) i els realitzats en absència de microsomes (solució tampó) o en absència d'NADP(H) (vegeu Figura 4.3.5. B), tot indicant certa implicació dels enzims P450 en la generació de la iminoquinona **2**. Val a dir que en aquest cas també s'observà un increment en la formació de l'adducte **13** en presència de microsomes prèviament portats a 100 °C (Figura 4.3.5. B).



**Figura 4.3.5.** Estudi de la formació de l'adducte **13** amb el temps a partir de incubacions de fenol **1** (125  $\mu\text{M}$ ) en presència de GSH (250  $\mu\text{M}$ ) i (A) HLM o (B) RLM a 37°C.

#### 4.3.5. Incubacions de P(1)PAP en presència de microsomes hepàtics humans

Tal i com s'ha indicat en la introducció d'aquesta memòria (apartat 2.1), els esters del PAP, i més concretament els diesters, van ser els principals composts detectats en els olis tòxics. Degut a l'alta lipofília que presenten aquests diesters del PAP, junt amb la facilitat que tenen per ser hidrolitzats per part de la lipasa pancreàtica (vegeu apartat 4.1 d'aquesta memòria), es van realitzar les incubacions amb HLM utilitzant el monopalmitoïl derivat del PAP (P(1)PAP) com a model d'ester.

En tots els experiments fets es va observar només la formació del producte derivat de la hidròlisi del monoèster, que en aquest cas es tractava del PAP; en canvi, no es va detectar el producte resultant de la 4'-hidroxilació del P(1)PAP. Degut a la baixa concentració de PAP formada en aquestes incubacions, tampoc es va poder observar la subseqüent oxidació a fenol **1**.

Amb tot, les incubacions del PAP en presència de microsomes hepàtics, tant de rata com humans, han confirmat la capacitat dels enzims P450 per hidroxilar el PAP generant el fenol **1**, tal com suggerien estudis preliminars del metabolisme *in vivo* del PAP<sup>(11,12)</sup>. La determinació dels corresponents paràmetres cinètics suggereix, però, una baixa afinitat pel substrat en ambdós casos, amb uns valors de  $K_m$  de l'ordre de mil·limolar. El paràmetre indicador de l'eficàcia de l'enzim ( $k_{cat}/K_m$ ) fou lleugerament més alt per al cas dels RLM.

Incubacions de PAP en presència d'HLM i d'inhibidors específics de certs isoenzims del P450 indiquen que hi ha diversos enzims implicats en la 4'-hidroxilació del PAP. Tot i que a partir d'aquests estudis no es poden obtenir dades exactes sobre la contribució de cadascun dels enzims P450 vistes la poca selectivitat d'alguns dels inhibidors i la dificultat per extrapolar les activitats del isoenzims recombinants, els enzims 2C9, 2D6, 2C18, 2C8 i 2E1 semblen ser els principals implicats. Cal esmentar que tres d'aquests isoenzims actius en el metabolisme oxidatiu del PAP (2E1, 2C8 i 2C18) han estat detectats en teixit pulmonar<sup>(69, 70)</sup>, i precisament el 70% del pacients de la SOT van patir d'afeccions pulmonars durant la fase aguda de la malaltia<sup>(2)</sup>.

Per altra banda, la implicació d'aquests enzims del P450 en la bioactivació del PAP té un interès afegit degut al grau de polimorfisme que presenten aquests enzims<sup>(71,72)</sup>, de manera que podria explicar les diferències de susceptibilitat a la SOT per part de la població exposada. Val a dir, però, que el polimorfisme d'aquests enzims del P450 és probable que no sigui el responsable d'aquesta

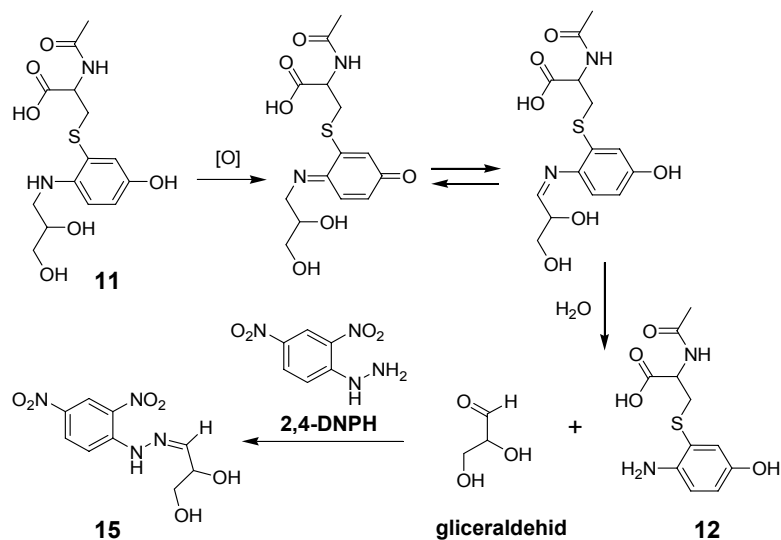
diferència en la susceptibilitat, ja que aquesta influència només és significativa en els casos on només un isoenzim determinat és responsable del metabolisme. Per tant, les diferències de resposta a la SOT entre la població exposada haurien de ser atribuïdes més aviat a una qüestió de dosi.



#### 4.4. GENERACIÓ D'INTERMEDIS IMINOQUINÒNICS EN LA BIOACTIVACIÓ DE LA PAA EN PRESENCIA DE MICROSOMES DE FETGE HUMÀ. ESTABLIMENT D'UN POTENCIAL VINCLE DE UNIÓ ENTRE LA SEM I LA SOT

##### 4.4.1. Detecció del gliceraldehid format a partir de l'evolució del conjugat d'*N*-acetilcisteïna **11**

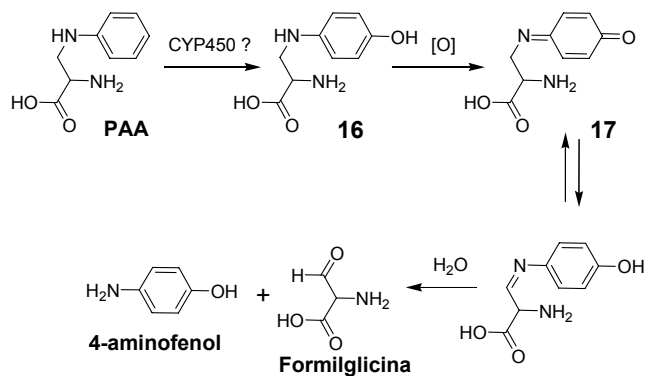
Tal com es descriu en l'apartat 4.2. d'aquesta memòria, els conjugats de la família del glutatió es poden generar a través de l'addició de Michael d'aquests tiols sobre la imonoquinona **2** derivada de l'oxidació del fenol **1**, metabòlit del PAP. Aquests conjugats, però, són inestables i poden tornar-se a oxidar donant lloc als corresponents intermedis iminoquinònics per acabar generant en un últim estadi el gliceraldehid i els derivats del 4-aminofenol (vegeu Figura 4.2.8). Així com la formació d'aquests conjugats del 4-aminofenol és fàcilment detectable per HPLC, la detecció del compost carbonílic no és tant immediata degut a l'absència de grups cromòfors en la seva estructura. Per aquest motiu es va decidir derivatitzar el gliceraldehid amb 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) per donar lloc a la corresponent hidrazona, la qual ja és detectable per HPLC<sup>(73,74)</sup>. En aquest cas es va triar el conjugat d'*N*-AcCys **11** per estudiar la generació del gliceraldehid. Així, es va incubar **11** en tampó fosfat durant 15 h a 37 °C. Una vegada es confirmà la formació del corresponent conjugat del 4-aminofenol **12** per HPLC, s'addicionà un excés de 2,4-DNPH sobre el cru de reacció i es mantingué en agitació durant 15 min a 20 °C. La formació de la hidrazona **15** va ser confirmada per HPLC per comparació amb el corresponent estàndard independentment sintetitzat. Aquests resultats demostraven la formació del gliceraldehid a partir de l'oxidació, isomerització i hidròlisi d'un conjugat derivat del PAP com és el conjugat **11** (vegeu Figura 4.4.1). D'altra part, també van causar que ens plantegéssim realitzar un estudi anàleg de metabolisme *in vitro* per al cas de la PAA.



**Figura 4.4.1.** Etapes proposades per a la formació de la hidrazona **15** a partir del conjugat de l'*N*-AcCys **11**.

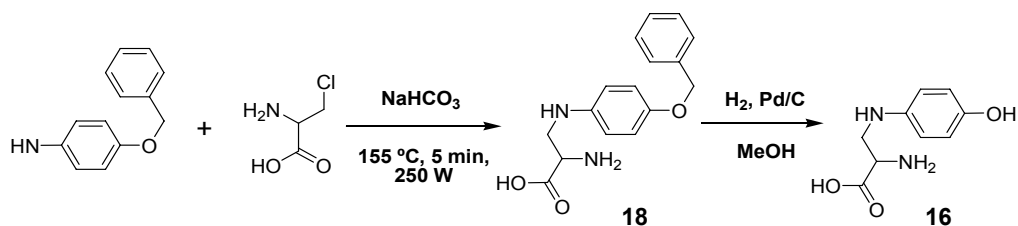
#### 4.4.2. Generació de la iminoquinona derivada de la PAA **17**

Si ens fixem en l'estructura de la PAA, podem observar la semblança que té amb el PAP. En concret, ambdós compostos tenen un  $\text{CH}_2$  adjacent al nitrogen de l'anilina. És per això que ens plantejarem la possibilitat que el derivat fenòlic de la PAA **16**, un dels possibles metabòlits de la PAA (vegeu apartat 2.4.2. d'aquesta memòria), seguis la ruta descrita a la Figura 4.2.8. generant en un últim estadi 4-aminofenol i formilglicina (vegeu Figura 4.4.2.).



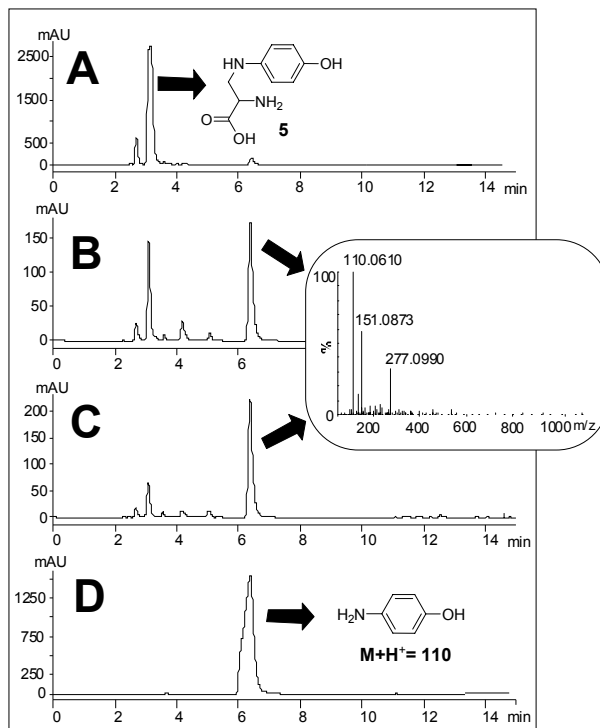
**Figura 4.4.2.** Etapes proposades per a la transformació de la PAA en 4-aminofenol i formilglicina.

Per tal de verificar aquesta hipòtesi, calia sintetitzar prèviament el fenol **16**. Així, a partir de la  $\beta$ -cloroalanina i la 4-benziloxianilina s'obtingué l'èter benzílic **18** mitjançant síntesi activada per microones. La posterior hidrogenòlisi de **18** per desprotegir el grup hidroxil va donar lloc al fenol desitjat. A la Figura 4.4.3. es descriuen les etapes de síntesi de **16**.



**Figura 4.4.3.** Etapes per a l'obtenció del fenol **16** a partir de la 4-benziloxianilina i la  $\beta$ -cloroalanina.

Una vegada sintetitzat **16**, es procedí a l'obtenció de la corresponent iminoquinona per veure si era tan inestable com **2**. Així, el fenol **16** es tractà amb òxid de plata, però en aquest cas la iminoquinona **17** no va poder ser detectada per HPLC. El que s'observà fou la formació del 4-aminofenol directament. De fet, després de 20 min de reacció la transformació de **16** en 4-aminofenol era pràcticament quantitativa, tal com s'indica a la Figura 4.4.4.

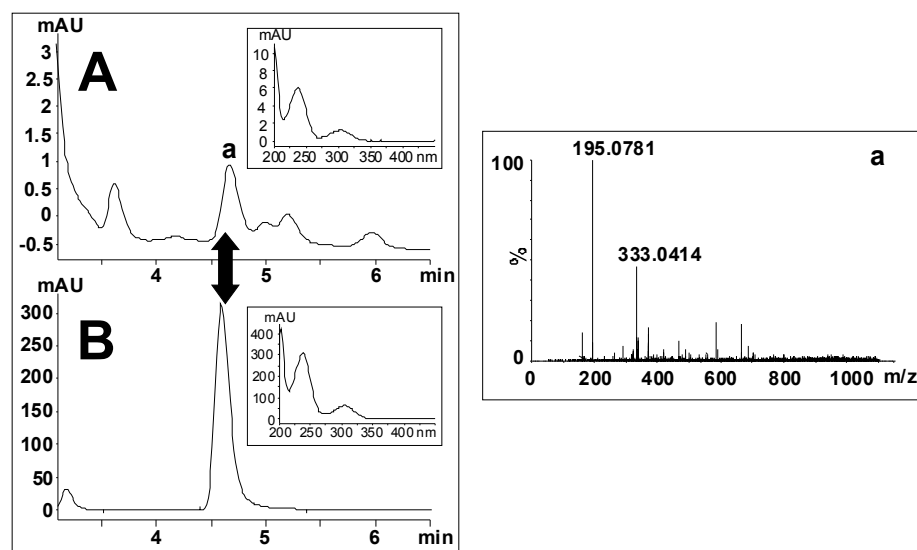


**Figura 4.4.4.** Perfil d'HPLC de l'oxidació del fenol **16** en presència d'òxid de plata a (A)  $t = 0$  min, (B)  $t = 5$  min, i (C)  $t = 20$  min. (D) Perfil d'HPLC del 4-aminofenol estàndard. L'espectre d'ESI-HRMS del nou pic format es troba també inserit a la figura.

Aquests resultats indicaven que la iminoquinona derivada de la PAA **17** era molt més inestable que la iminoquinona **2** derivada del PAP. En qualsevol cas, semblava que la iminoquinona **17**, una vegada formada, isomeritzava ràpidament a la corresponent imina, la qual s'hidrolitzava donant lloc al 4-aminofenol, tal com s'havia predit (vegeu Figura 4.4.2.). Pel mateix motiu que el gliceraldehid, el compost carbonílic suposadament generat en aquestes reaccions (formilglicina) no va poder ser detectat per HPLC. Posteriorment es va tractar de sintetitzar aquest aldehid per tal de facilitar la seva detecció en el cru de reacció, però tots els intents foren infructuosos, probablement degut a la inestabilitat que presenten aquest tipus d' $\alpha$ -aminoaldehyds<sup>(75-77)</sup>.

#### 4.4.3. Assajos *in vitro* amb la PAA en presència de microsomes de fetge humà

Tal i com es descriu a l'apartat 2.4.2. d'aquesta memòria, a partir dels estudis de metabolisme *in vivo* realitzats en rates per Adachi i col·laboradors, es van detectar quatre metabòlits de la PAA en orina (vegeu Figura 2.4.2.), dos dels quals (**D** i **E**) haurien estat generats mitjançant la prèvia formació del fenol **16**<sup>(52)</sup>. Per altra banda, acabem de veure que aquest fenol pot ser oxidat amb òxid de plata donant lloc a una iminoquinona que immediatament isomeritza i s'hidrolitza generant 4-aminofenol. A més, segons es discuteix en l'apartat 4.3. d'aquesta memòria, incubacions de PAP en presència d'HLM donen lloc al corresponent derivat fenòlic (**1**) mitjançant una hidroxilació en la posició *para* de l'anell aromàtic. Tots aquests fets feien pensar que la PAA podria seguir una biotransformació similar a l'observada pel PAP. Per aquest motiu varem dur a terme estudis del metabolisme *in vitro* de la PAA mitjançant incubacions en presència d'HLM i NADP(H). Després de 15 min de incubació, es va poder detectar per HPLC la formació del derivat fenòlic de la PAA (**16**), tal com mostra a la Figura 4.4.5.

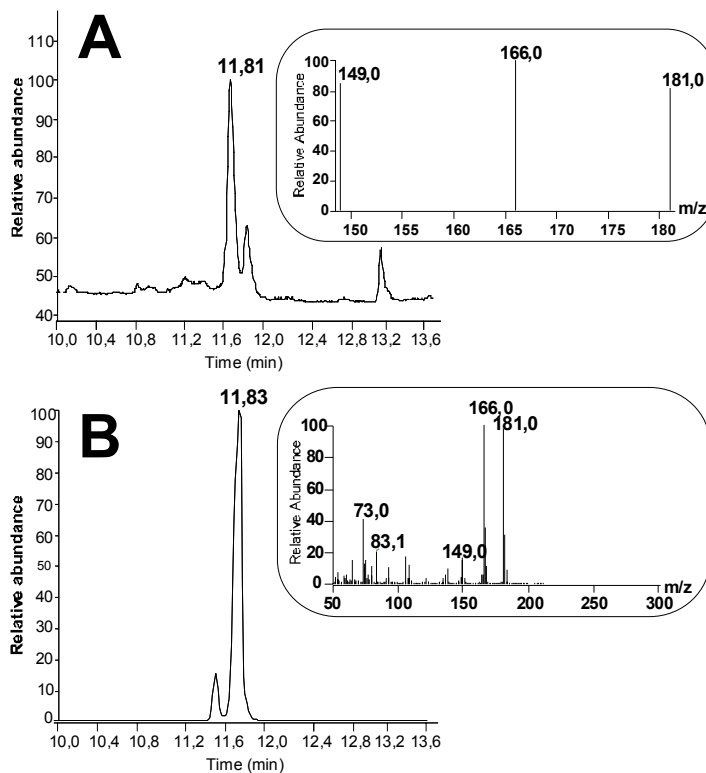


**Figura 4.4.5.** (A) Perfil d'HPLC de la incubació *in vitro* de PAA en presència d'HLM i NADP(H) després de 15 min. (B) Perfil d'HPLC del fenol **16** estàndard prèviament sintetitzat. També es mostra l'espectre d'ESI-HRMS del pic **a**.

Aquests resultats confirmaven, per tant, que la PAA era metabolitzada pels HLM donant lloc al corresponent derivat 4'-hidroxilat, anàlogament al cas del PAP. Per tant, podríem considerar el fenol **16** com a metabòlit de la PAA. A més, segons hem vist anteriorment, aquest fenol **16** seria capaç de generar intermedis potencialment tòxics, com la iminoquinona **17** derivada de la seva oxidació. La diferència en el cas de la PAA és que aquesta iminoquinona **17** era més reactiva que la corresponent derivada del PAP (**2**).

#### **4.4.4. Detecció del 4-aminofenol en les incubacions de PAA en presència de microsomes de fetge humà**

Tenint en compte la possibilitat que el fenol **16** podria oxidar-se espontàniament a iminoquinona, com en el cas del fenol derivat del PAP (**1**) (vegeu apartat 4.3.4. d'aquesta memòria), es van realitzar incubacions de PAA en presència d'HLM i NADP(H), però en aquest cas deixant que el cru de reacció evolucionés durant tota una nit. Les mostres, prèviament derivatitzades amb BSTFA, es van analitzar per GC-MS utilitzant el mode SIM (m/z 149, 166, 181). Els resultats van permetre detectar la formació del 4-aminofenol al cru de reacció (vegeu Figura 4.4.6) fet que ja s'anticipava segons els resultats descrits a l'apartat 4.4.2.



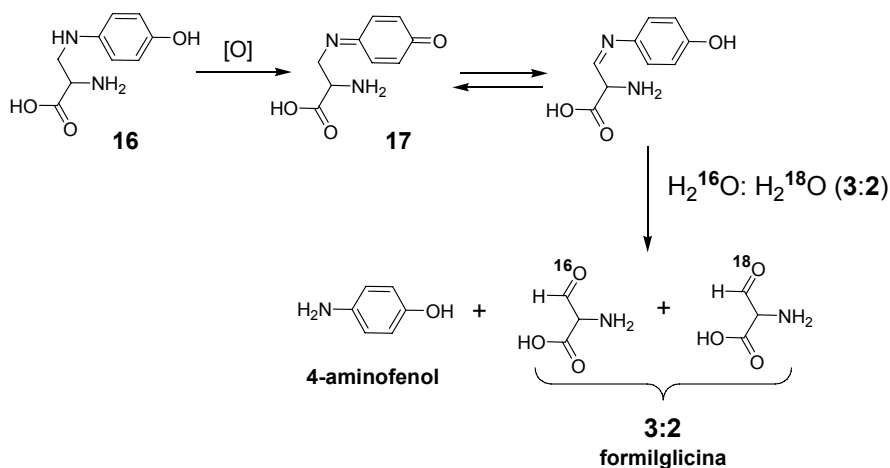
**Figura 4.4.6. (A)** Perfil de GC-MS d'una mostra de incubació de la PAA en presència d'HLM i NADP(H) durant 15 h a 37 °C i posterior derivatització amb BSTFA, utilitzant el mode SIM (m/z: 149, 166, 181), comparat amb **(B)** perfil de GC-MS del 4-aminofenol siliat estàndard.

La identificació d'aquest metabòlit final a partir de la biotransformació de la PAA ens va induir a tractar de confirmar la formació concomitant del corresponent aldehyd, en aquest cas la formilglicina.

#### 4.4.5. Detecció de la formilglicina per GC-MS utilitzant $H_2^{18}O$ en el medi de incubació

Degut a les dificultats trobades a l'hora de sintetitzar la formilglicina per tal d'utilitzar-la com a estàndard, necessitàvem una estratègia alternativa per la seva

identificació en les incubacions. Segons es descriu a la Figura 4.4.2., aquest aldehid provindria de l'oxidació, isomerització i hidròlisi del fenol **16** en el medi aquós on es realitzen les incubacions. Tenint en compte aquests fets, varem predir que si utilitzàvem una mescla coneguda de  $H_2^{16}O$  i  $H_2^{18}O$  en el medi de incubació, es podria identificar la formilglicina de manera inequívoca per GC-MS, ja que l'oxigen del carbonil generat en l'etapa de hidròlisi estaria marcat aproximadament en la mateixa proporció isotòpica utilitzada en aquest medi de incubació, tal i com es mostra a la Figura 4.4.7.

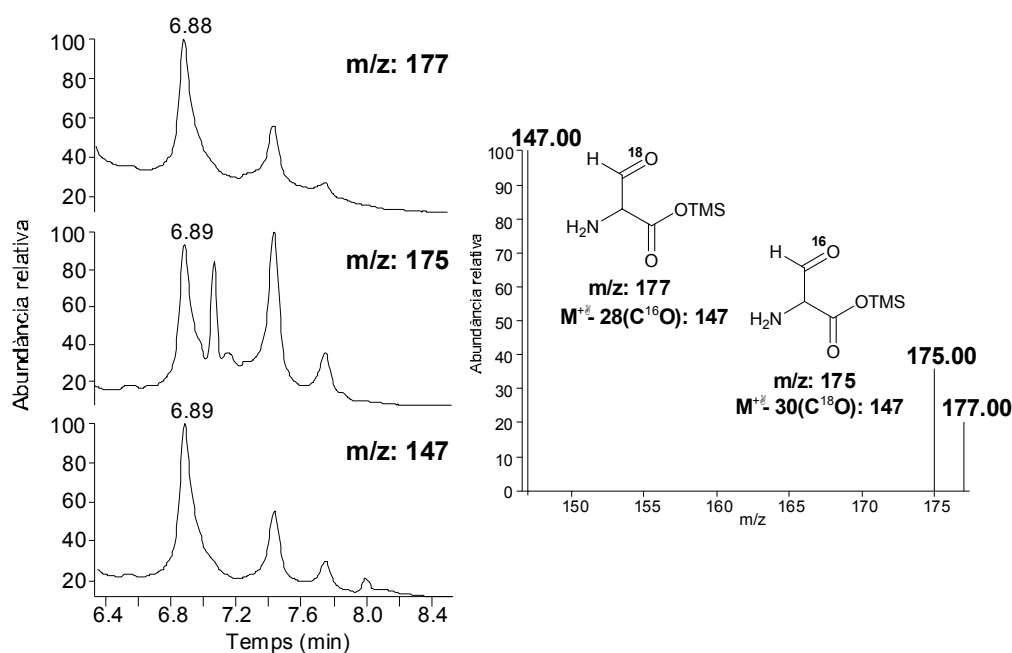


**Figura 4.4.7.** Etapes proposades per la formació de la formilglicina a partir del fenol **16**. També es mostra la proporció isotòpica de l'aldehid esperat segons la proporció isotòpica utilitzada en el medi de incubació, en aquest cas  $H_2^{16}O:H_2^{18}O$  (3:2).

Llavors, es van realitzar incubacions de PAA en presència d'HLM i NADP(H) fent servir una mescla d'aigua  $H_2^{16}O:H_2^{18}O$  (3:2) per preparar la solució tampó utilitzada com a medi de incubació. Posteriorment, les mostres es van derivatitzar amb BSTFA i es van analitzar per GC-MS. En aquest cas, degut a que el medi de incubació (tampó amb  $H_2^{16}O:H_2^{18}O$  (3:2)) seria el responsable de la hidròlisi de la base de Schiff, s'haurien d'obtenir dos isotopòmers de formilglicina amb un pes molecular diferent i amb una relació entre ells de 3:2 aproximadament. Per tal d'incrementar la sensibilitat de l'anàlisi es va utilitzar el mode SIM ( $m/z$ : 147, 175, 177), on 175 i 177 corresponien a la massa molecular de la formilglicina



amb  $^{16}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$ , respectivament, i 147 a la massa del producte de descarbonilació típica dels aldehids, per ambdós casos. A la Figura 4.4.8. podem observar tres cromatogrames amb un pic comú a 6.8 min. En els tres casos l'espectre de masses d'aquest pic conté les masses esperades 147, 175 i 177. A més, la relació entre els pics 175 i 177 és aproximadament de 3:2, proporció que es correspon amb la relació isotòpica de l'aigua utilitzada per a les incubacions.

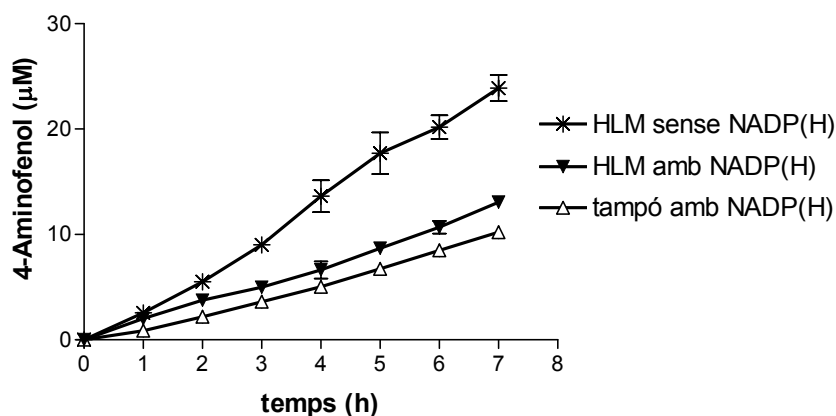


**Figura 4.4.8.** Perfil de GC-MS utilitzant el mode SIM ( $m/z$ : 147, 175 i 177) d'una mostra de incubació de PAA en presència d'HLM i NADP(H), fent servir una mescla d'aigua  $\text{H}_2^{16}\text{O}:\text{H}_2^{18}\text{O}$  (3:2) com a medi de incubació, durant 15 h a  $37^\circ\text{C}$  i posterior derivatització amb BSTFA. S'utilitzà l'aplicació *extract ion* per tal de buscar els pics amb les masses 177, 175 i 147. En els tres cromatogrames corresponents s'observa un pic a 6.8 min amb un espectre de masses que conté les tres masses esperades i amb una relació entre els pics 175 i 177 de 3:2, tal com s'havia anticipat.

Per tant, aquests resultats confirmaven la formació de la formilglucina com a co-metabòlit del 4-aminofenol en la biotransformació de la PAA en presència d'HLM.

#### 4.4.6. Formació del 4-aminofenol en incubacions amb el fenol 16

Per tal de confirmar la generació del 4-aminofenol a través de l'oxidació, isomerització i hidròlisi del fenol **16** obtingut com a metabòlit en les incubacions de PAA en presència d'HLM, i també per estudiar quina era la participació enzimàtica en aquest procés, es van dur a terme incubacions de **16** amb HLM en presència i absència d'NADP(H) i també en absència de microsomes (medi tampó) i NADP(H). L'estudi va mostrar en tots els casos un creixement en la formació del 4-aminofenol amb el temps, especialment en presència d'HLM i absència d'NADP(H) (vegeu Figura 4.4.9). Aquest resultat es podria explicar mitjançant les propietats reductores de l'NADP(H), de manera que aquest podria protegir el fenol de la seva oxidació.

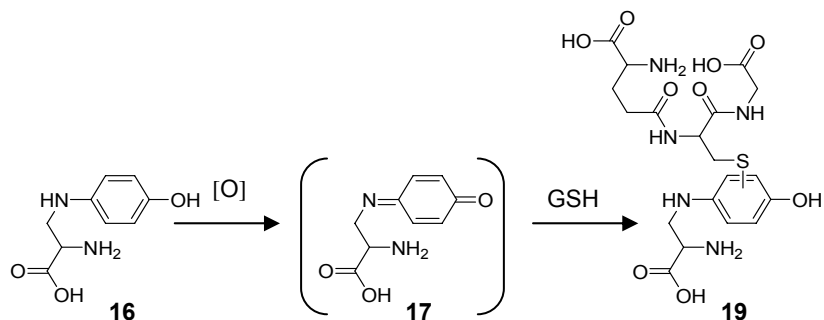


**Figura 4.4.9.** Formació en el temps del 4-aminofenol en incubacions de fenol **16** (250 µM) a 37°C. Les incubacions es van realitzar en tres condicions diferents: en presència d'HLM sense NADP(H), en presència d'HLM i NADP(H), i en absència d'HLM (medi tampó) amb NADP(H).

En qualsevol cas, aquests resultats indicaven que l'oxidació del fenol **16** a la corresponent iminoquinona **17** no era un procés enzimàtic, sinó que tenia lloc espontàniament.

#### 4.4.7. Detecció de la formació del conjugat **19**

Tal com es descriu a l'apartat 4.4.2 d'aquesta memòria, no va ser possible aïllar la iminoquinona **17** a partir de l'oxidació del fenol **16** amb òxid de plata degut. De fet, la formació d'aquesta iminoquinona no va poder ni ser detectada per HPLC ja que es transformava ràpidament en 4-aminofenol. Per aquest motiu varem decidir confirmar la formació de la iminoquinona **17** d'una manera indirecta, a través de la formació del corresponent tio-conjugat **19** (vegeu Figura 4.4.10).



**Figura 4.4.10.** Etapes proposades per a la generació del conjugat de glutatió **19** a partir del fenol **16** via la prèvia formació de la iminoquinona **17**.

Així, tenint en compte l'autoxidació del fenol **16** prèviament observada, es va tractar de generar el corresponent conjugat de glutatió **19** mitjançant la incubació de **16** en presència de glutatió en un medi tamponat a 37 °C. L'anàlisi de les mostres per HPLC va mostrar la formació amb el temps d'un nou pic amb un espectre d'UV típic dels adductes aminofenol-glutatió. A més, l'anàlisi per ESI-HRMS d'aquest nou pic va permetre la seva identificació com el conjugat esperat **19**. Per tant, la detecció d'aquest tio-conjugat confirmaria la generació d'aquesta iminoquinona **17** altament reactiva a partir de l'oxidació del fenol **16**. Cal esmentar que a més del conjugat **19**, també es va detectar la formació de 4-aminofenol en el medi d'incubació, fet que corrobora la labilitat d'aquesta espècie iminoquinònica, fins i tot en presència de glutatió.

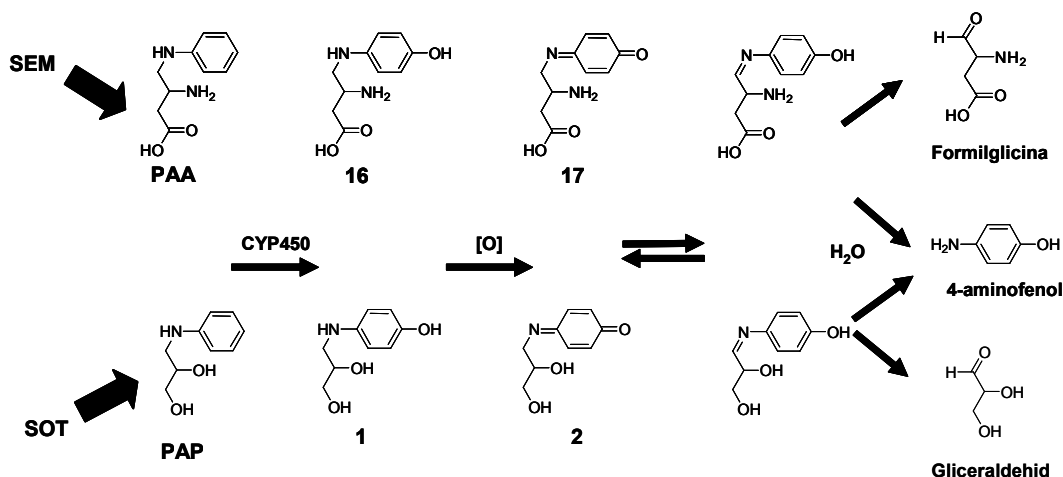
En resum, tots aquests resultats demostren que la PAA, un dels contaminants presents en els lots d'L-triptòfan responsables de la SEM, pot ser bioactivada pels HLM donant lloc al derivat fenòlic **16** com a principal metabòlit. Aquest metabòlit però, és inestable i pot ser novament oxidat generant la iminoquinona **17**. Malgrat que aquesta iminoquinona és massa reactiva per ser detectada per HPLC, la seva participació en la biotransformació de la PAA es pot deduir a través de la identificació inequívoca del 4-aminofenol i la formilglicina en el medi de incubació.

La formació d'aquests compostos pot ser racionalitzada d'una manera anàloga a la descrita anteriorment per al PAP. Així doncs, el PAP, biomarcador tòxic dels lots d'oli que van causar la SOT, pot ser bioactivat en presència d'HLM donant lloc al fenol **1**, el qual pot ser reoxidat per generar la iminoquinona **2**. A diferència de **17**, aquesta iminoquinona derivada del PAP, tot i ser inestable, pot ser detectada per HPLC. En absència d'agents nucleòfils, la iminoquinona **2** isomeritza a la corresponent base de Schiff la qual és posteriorment hidrolitzada donant lloc al 4-aminofenol i al gliceraldehid com a metabòlits finals. Per altra banda, estudis previs del metabolisme *in vivo* havien mostrat que l'administració intraperitoneal de PAP en rates produïa el derivat fenòlic **1** i paracetamol entre d'altres metabòlits <sup>(11, 12)</sup>. Per tant, tal i com succeeix amb el PAP, la bioactivació de la PAA en presència d'HLM passa per la generació d'intermedis iminoquinònics altament reactius.

Quant als potencials vincles de unió entre la SEM i la SOT, tal i com s'explica a l'apartat 2.4.2. d'aquesta memòria, Mayeno i col·laboradors havien demostrat la biotransformació del PAP en PAA mitjançant incubacions amb hepatòcits i HLM. En concret, els autors proposaven tres etapes d'oxidació, seguides d'una transaminació per tal d'explicar aquesta biotransformació<sup>(53)</sup>.

Els resultats que es presenten en aquest capítol suggereixen un altre vincle de unió entre la SEM i la SOT. En ambdós casos, la incubació dels biomarcadors tòxics de la malaltia (PAA i PAP, respectivament) són bioactivats en presència d'HLM donant lloc als corresponents derivats 4'-hidroxilats (**16** i **1**,

respectivament), els quals, en ser inestables, poden ser oxidats novament, mitjançant un procés no necessàriament enzimàtic, donant lloc a intermedis iminoquinònics (**17** i **2**, respectivament). Aquestes iminoquinones són altament reactives, especialment davant de nucleòfils<sup>(42)</sup>. En absència d'agents reductors, isomeritzen a la corresponent imina, la qual és hidrolitzada generant en un últim estadi 4-aminofenol i els aldehyds corresponents (formilglicina i gliceraldehid, respectivament). A la Figura 4.4.11. es mostren de manera esquemàtica aquestes etapes per a cadascuna de les síndromes.



**Figura 4.4.11.** Nou vincle proposat entre la SEM i la SOT, on la biotransformació de marcadors tòxics similars (PAA i PAP, respectivament) en presència d'HLM dona lloc al 4-aminofenol com a metabòlit comú, a més dels corresponents aldehyds (formilglicina i gliceraldehid, respectivament).

Cal esmentar que a partir de l'estudi *in vitro* dels efectes de la PAA sobre el nucli cel·lular d'hepatòcits de rata, Sidransky i col·laboradors van proposar que la PAA o un dels seus metabòlits podrien incorporar-se a proteïnes, probablement reemplaçant residus d'L-triptòfan o d'L-alanina<sup>(78)</sup>. Així, segons els resultats obtinguts, caldria considerar la possibilitat que la iminoquinona **17** derivada de la PAA s'enllaci covalentment als residus nucleòfils de proteïnes. En aquest context, s'ha pogut detectar la formació espontània del corresponent conjugat de glutatió **19**. Tot i així, la inestabilitat de la iminoquinona **17** es manifesta tant en presència

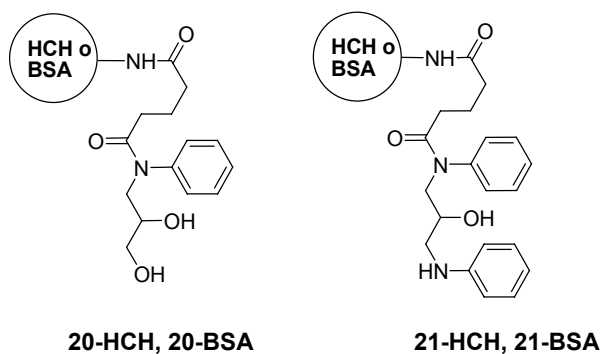
com en absència d'agents nucleòfils mitjançant la seva isomerització i posterior hidròlisi per donar lloc a 4-aminofenol i formilglicina. A més, la identificació del paracetamol com a metabòlit en dues soques de ratolins que havien estat tractades amb PAP  $^{14}\text{C}$ , indueix a pensar en una possible detecció d'aquest compost, o inclús del 4-aminofenol, en mostres biològiques relacionades amb la SEM. Si passés això, s'establiria un altre vincle de unió entre la SEM i la SOT, no només a través de la generació d'un metabòlit final comú de coneguda toxicitat (4-aminofenol)<sup>(61,79-82)</sup>, sinó també mitjançant la generació concomitant d'espècies carboníliques que podrien representar un factor de risc addicional<sup>(83,84)</sup>.

Amb tot, els paral·lelismes observats en les biotransformacions de la PAA i del PAP confirmarien l'existència d'una via comuna per a tots aquells xenobiòtics derivats de l'anilina que continguin hidrògens enllaçats al carboni adjacent al nitrogen anilínic, tal i com es mostrava a la Figura 4.2.8.

## 4.5. DESENVOLUPAMENT D'UN ASSAIG ELISA PER A LA DETECCIÓ DE PAP

### 4.5.1. Síntesi dels haptens 20 i 21 i preparació dels immunoreactius<sup>(\*)</sup>

L'estructura del PAP, en tenir dos grups hidroxil (un de primari i un de secundari) i un grup amino (secundari) lliures, permet la introducció d'un braç espaciador funcionalitzat mitjançant la formació d'un ester o d'una amida, respectivament. En aquest cas, es va triar l'opció de l'enllaç amida degut a motius d'estabilitat metabòlica. Així, la síntesi de l'haptè **20** tingué lloc a través de l'acilació del PAP amb anhidrid glutàric en presència de piridina. L'haptè **21** va ser sintetitzat seguint el mateix procediment però partint de bis-PAP; així, s'obtenia una molècula més gran que el PAP, aprofitant les propietats antigèniques que podria aportar la introducció d'un nou grup voluminós com el residu d'anilina. Els grups carboxílics dels haptens **20** i **21** van ser activats mitjançant la formació d'una anhidrid mixt per tal de facilitar la reacció amb l'HCH i la BSA, a pH 8, per formar els conjugats **20-HCH**, **20-BSA**, **21-HCH** i **21-BSA** (Figura 4.5.1.). El grau de conjugació es verificà per MALDI-TOF-MS i els conjugats **20-HCH** i **21-HCH** es van utilitzar per a generar els antisèrums As127-As128, i As129-As130-As131, respectivament.



**Figura 4.5.1.** Estructura del antigens derivats del PAP (**20-HCH** i **20-BSA**) i del bis-PAP (**21-HCH**, **21-BSA**).

<sup>(\*)</sup> Treball realitzat per la Dra. Maia Lloveras i Rafael Campos.

#### 4.5.2. Desenvolupament d'un ELISA indirecte<sup>(\*)</sup>

Tal com s'explica a l'apartat 2.5.3.1. d'aquesta memòria, la detecció immunoquímica de molècules orgàniques petites té lloc sota condicions de competència. En un ELISA indirecte es determina l'habilitat de l'analit (An) per competir amb la formació de l'immunocomplex antigen de recobriment (Ag)-anticòs (Ac); per tant, tindran lloc dues reaccions d'equilibri:



on la relació entre les dues constants d'afinitat ( $K_{eq}(1)$  i  $K_{eq}(2)$ ) determinarà les característiques de l'assaig.

Per tal d'analitzar l'afinitat dels As generats respecte els antígens de recobriment **20-BSA** i **21-BSA**, es va realitzar un ELISA no-competitiu. Posteriorment es van estudiar les diferents combinacions As/Ag per examinar el reconeixement del PAP com a analit. L'antisèum As128 fou el que donà resultats més bons amb els conjugats **20-BSA** i **21-BSA** com a antígens de recobriment, amb uns valors d'IC<sub>50</sub> de 50 i 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivament.

#### 4.5.3. Avaluació d'un immunoassaig per al PAP<sup>(\*\*)</sup>

La combinació As 128/**21-BSA** va ser finalment seleccionada per estudiar els efectes sobre l'immunoassaig de diferents paràmetres fisicoquímics, tal com el pH, la temperatura, el temps, la composició del tampó, la concentració de Tween 20 o la força iònica. Els resultats van indicar, per una banda, que la temperatura, el temps de incubació, el pH i la força iònica no afectaven d'una manera significativa l'assaig. En canvi, la concentració de Tween 20 i la presència d'agents bloquejants

---

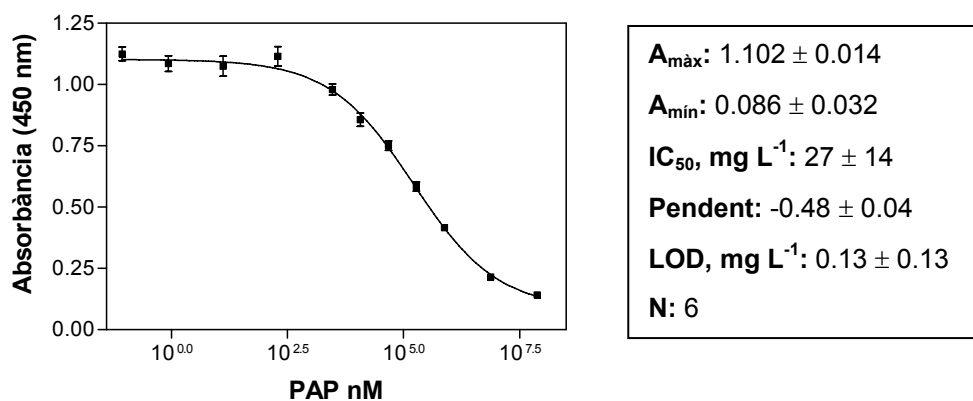
<sup>(\*)</sup> Treball realitzat per Begoña Varela

<sup>(\*\*)</sup> Treball realitzat en col·laboració amb Begonya Varela



tenien força influència. Quan s'afegia BSA enlloc de Tween 20 al tampó d'assaig, disminuïen els valors de  $IC_{50}$ ; és a dir, augmentava la sensibilitat de l'assaig. Malauradament, s'observà que la utilització de BSA produïa també una disminució del pendent de la corba. Per determinar quin era el percentatge de BSA més adient, es van fer estudis amb diferents concentracions de proteïna. A partir dels resultats obtinguts, es va escollir un 0.15 % de BSA com a concentració de compromís entre l'augment de la sensibilitat i la disminució del pendent de l'assaig. A més, es van fer proves amb diferents dissolvents orgànics com el tetrahidrofurà, el metanol, l'etanol, l'acetona o el dioxà, i es va analitzar el seu efecte sobre l'assaig. Sorprenentment, el metanol i l'etanol semblava que produïen un augment de l'absorbància màxima, però per altra banda disminuïen la sensibilitat de l'assaig.

Per tant, les condicions de l'immunoassaig amb la combinació **As 128/21-BSA** van ser finalment: tampó PBS 10 mM amb un 0.15% de BSA a pH 7.5. A la Figura 4.5.2. es mostra la corba de calibratge estàndard obtinguda en aquestes condicions junt amb els corresponents paràmetres de l'assaig.

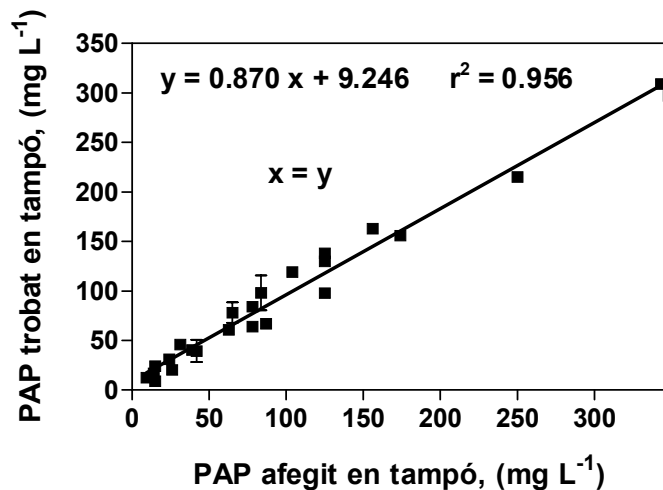


**Figura 4.5.2.** Corba de calibratge estàndard i paràmetres de l'immunoassaig realitzat amb la combinació **As 128/21-BSA** en condicions de tampó PBS 10 mM amb un 0.15% de BSA i a pH 7.5.

Posteriorment es va avaluar l'especificitat de l'assaig preparant diverses corbes estàndards en presència d'alguns compostos estructuralment relacionats

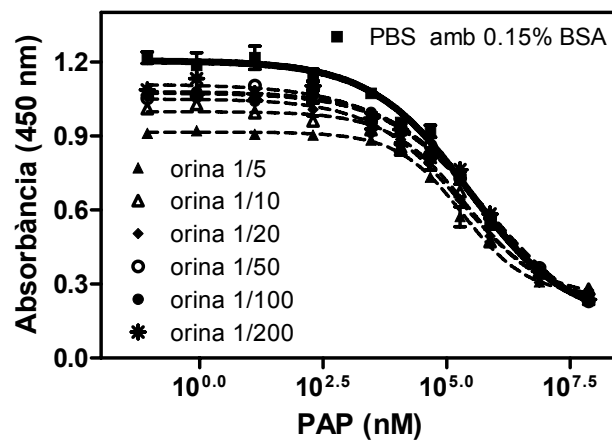
amb el PAP i que podrien estar presents tant en l'oli tòxic real com en l'oli tòxic model<sup>(15)</sup>, com són l'anilina, l'oleanilida, l'O(1)PAP i l'OO(1,2)PAP. A més, també es van seleccionar el 4-aminofenol i l'àcid **3** per a fer aquests estudis com a metabòlits del PAP detectats en assaigs *in vivo*, tal i com s'explica a l'apartat 2.3.2. d'aquesta memòria<sup>(11,12)</sup>. Malauradament, la baixa solubilitat dels derivats esterificats del PAP en el medi de l'assaig va impedir la determinació de les corresponents reactivitats creuades. Per la resta de compostos, els resultats van indicar una reactivitat creuada negligible, excepte per l'oleanilida, la qual presentà un valor del 9%.

Per altra banda, es va avaluar l'exactitud de l'assaig preparant mostres cegues (N=24) de PAP en tampó PBS 10 mM amb un 0.3% de BSA i mesurant-les amb l'ELISA As128/21-BSA desenvolupat. Els resultats varen indicar una bona exactitud en tampó segons el factor de correlació ( $r^2 = 0.957$ ) obtingut a partir de la regressió lineal, la qual mostrava un pendent proper a 1 ( $y = 0.870 x + 9.246$ ) (vegeu Figura 4.5.3)



**Figura 4.5.3.** Gràfic on es mostra la correlació entre els valors de concentració de PAP afegit en tampó i els valors de concentració de PAP quantificats amb l'ELISA desenvolupat. Les mostres (N=24) es van preparar afegint diferents concentracions de PAP en tampó PBS 10 mM amb un 0.3% de BSA.

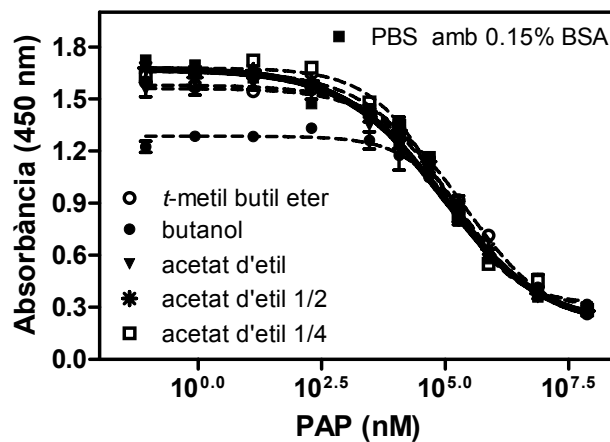
Tenint en compte que la finalitat de l'assaig consistia en poder detectar PAP en fluids d'animals que haguessin ingerit prèviament oli tòxic model, el següent pas fou tractar d'avaluar l'exactitud de l'ELISA en un fluid biològic. En aquest cas es va utilitzar orina humana com a matriu biològica ja que, com ja s'ha esmentat anteriorment, no s'ha trobat encara un model animal adient. Es va preparar un "pull" d'orina humana mesclant mostres d'orina provinents de 10 individus diferents (5 dones i 5 homes). Els resultats varen indicar la presència de interferències no específiques que impedièren realitzar mesures directes de PAP amb l'ELISA As128/21-BSA, fins i tot després de diluir 200 vegades la mostra (vegeu Figura 4.5.4.)



**Figura 4.5.4.** Efecte matriu produït per l'orina humana, després de diluir-la diverses vegades, a l'ELISA As128/21-BSA. Les línies discontinues representen les corbes estàndard obtingudes amb les mostres d'orina i la línia contínua representa la corba estàndard obtinguda amb tampó.

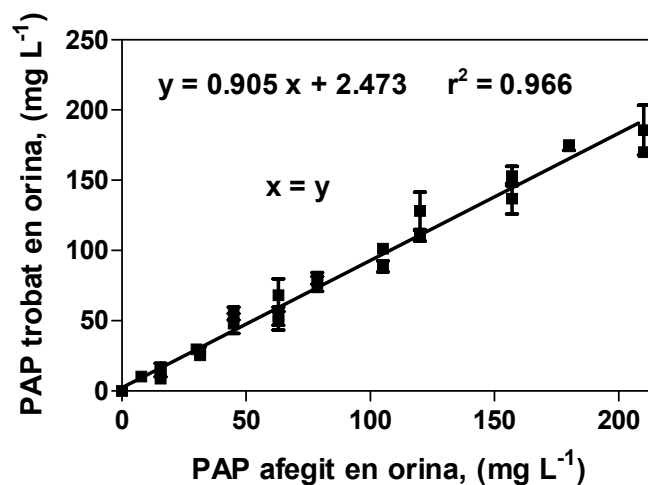
Per aquest motiu, es va tractar de minimitzar l'efecte matriu de la mostra mitjançant mètodes de tractament de mostra senzills. Així, es van realitzar extraccions de l'orina amb diferents dissolvents orgànics (toluè, *t*-butil metil èter, acetat d'etil i butanol) com a mètode de *clean-up*, i es van avaluar els factors de recuperació i el seu efecte a l'hora de disminuir les interferències. A partir dels

resultats obtinguts es va decidir descartar el toluè per motius de baixa recuperació i el butanol per interferir en l'assaig (vegeu Figura 4.5.5). En canvi, el *t*-metil butil èter i l'acetat d'etil sí que van mostrar una disminució significativa en l'efecte matriu. Tenint en compte els factors de recuperació d'aquests dos dissolvents (55% per al cas del el *t*-metil butil èter i 85% per al cas de l'acetat d'etil), es va escollir l'acetat d'etil com a dissolvent orgànic per fer el *clean-up* de l'orina. Per tal de veure si l'assaig millorava, es van fer proves diluint els extractes d'acetat d'etil varies vegades. Els resultats van indicar, com mostra la Figura 4.5.5, que dues dilucions de l'extracte eren suficients per eliminar les interferències no específiques que provocaven l'efecte matriu.



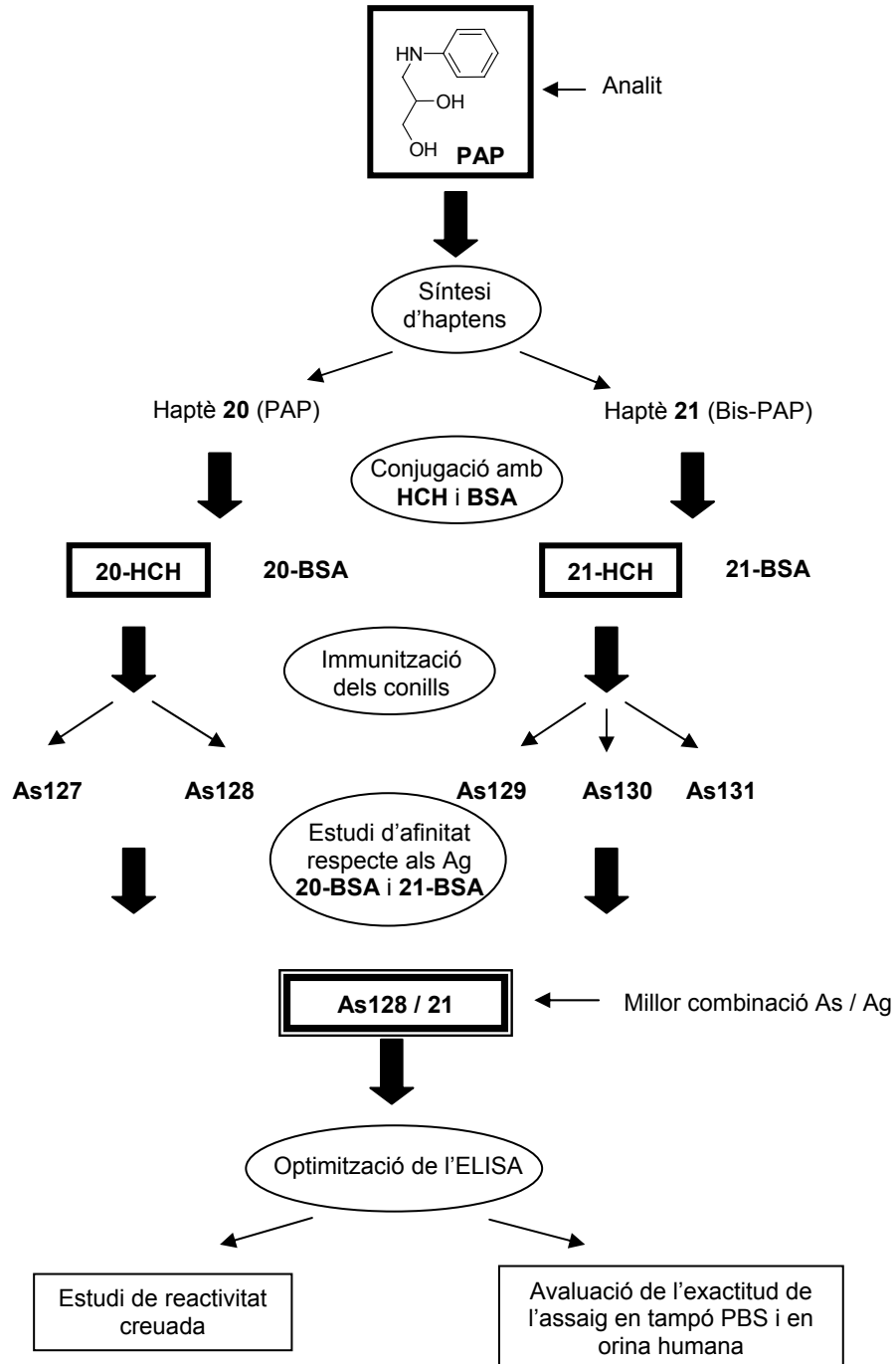
**Figura 4.5.5.** Efecte matriu produït per l'orina humana, després d'un *clean up* amb diferents dissolvents orgànics, a l'ELISA As128/21-BSA. Les línies discontinues representen les corbes estàndard obtingudes amb les mostres d'orina i la línia contínua representa la corba estàndard obtinguda amb tampó.

Per tant, l'exactitud de l'ELISA As128/21-BSA en mostres d'orina humana es va avaluar preparant mostres cegues (N=24) en orina que posteriorment van ser extretes amb acetat d'etil i diluïdes a la meitat amb tampó PBS 10 mM amb 0.3% BSA. Els resultats van mostrar també en aquest cas una bona exactitud segons el factor de correlació ( $r^2 = 0.965$ ) obtingut a partir de la regressió lineal, la qual mostrava un pendent proper a 1 ( $y = 0.905x + 2.47$ ) (vegeu Figura 4.5.6)



**Figura 4.5.6.** Gràfic on es mostra la correlació entre els valors de concentració de PAP afegit en orina humana i els valors de concentració de PAP quantificats amb l'ELISA desenvolupat. Les mostres (N=24) es van preparar afegint diferents concentracions de PAP en orina humana i posteriorment es van extreure amb acetat d'etil i es van diluir a la meitat amb tampó PBS 10 mM amb un 0.3% de BSA.

En resum, a partir de la síntesi dels haptens adients s'obtingueren anticossos específics contra el PAP. En concret, l'haptè derivat del PAP fou l'escollit per a la immunització una vegada conjugat a la proteïna HCH (**21-HCH**). Els anticossos obtinguts varen ser utilitzats per a desenvolupar un ELISA, el qual una vegada optimitzat tingué un límit de detecció de 130 µg L<sup>-1</sup>. A la Figura 4.5.7. es mostra un esquema de les etapes seguides per a l'obtenció d'aquest ELISA.



**Figura 4.5.7.** Esquema de les etapes seguides per a l'obtenció d'un ELISA per detectar PAP.

Aquest límit de detecció obtingut seria suficient per analitzar mostres d'oli contaminat, ja que la quantitat de PAP en aquests olis és aproximadament uns 50 mg L<sup>-1</sup>. A més, tal com es discuteix a l'apartat 4.1. d'aquesta memòria, el PAP pot ser generat en el tracte gastrointestinal mitjançant l'acció de la lipasa pancreàtica humana sobre els mPAPs i els dPAPs. Aquests esters han estat detectats a l'oli tòxic en concentracions de l'ordre de 150 mg L<sup>-1(8)</sup>, i també han estat generats en quantitats del mateix ordre en l'oli tòxic model desenvolupat al nostre laboratori pel Dr. Jordi Escabrós<sup>(15)</sup>, el qual ha estat utilitzat recentment en assaigs amb animals model.

Tots aquests antecedents ens indiquen el PAP com un compost crucial a l'hora d'estudiar la farmacocinètica i toxicitat dels seus derivats esterificats. Per altra banda, estudis del metabolisme *in vivo* del PAP han mostrat que aquesta és una molècula suficientment polar com per ser eliminada a través de l'orina sense cap alteració<sup>(11,12)</sup>, tot i que sembla ser que també pot ser bioactivada pels enzims P450 donant lloc a metabòlits de potencial toxicitat (vegeu apartat 4.3 d'aquesta memòria). Per tant, si tenim en compte aquests antecedents, l'ELISA desenvolupat en aquest treball podria ser una eina de gran utilitat a l'hora d'analitzar els nivells de PAP en teixits i/o fluids biològics una vegada es trobi un model animal adient per a estudiar la SOT.





**Capítol 5**  
**CONCLUSIONS**



- I. Els derivats mono- i diesterficats del PAP són substrats de la lipasa pancreàtica humana segons la detecció dels corresponents productes de hidròlisi en les incubacions realitzades amb aquest enzim. També s'ha observat una estereoselectivitat per l'enantiòmer S. Per tant, la hipotètica ingestió d'aquests esters del PAP continguts en l'oli tòxic donaria lloc a PAP en un últim estadi. Aquest fet justifica l'interès d'aprofundir en l'estudi del metabolisme del PAP.
  
- II. El derivat fenòlic del PAP **1**, compost detectat com a metabòlit després de l'administració intraperitoneal de PAP ( $^{14}\text{C}$ ) en dues soques de ratolins<sup>(11,12)</sup>, pot ser oxidat generant la iminoquinona **2**, la qual pot ser capturada per compostos amb un grup tiol lliure donant lloc als corresponents adductes de Michael. Aquests adductes són inestables i poden tornar-se a oxidar generant nous intermedis iminoquinònics que en presència de tiols poden ser novament capturats donant lloc a bis- i tris-adductes. En canvi, en absència d'aquests tiols, els nous intermedis iminoquinònics formats isomeritzen a la corresponent base de Schiff, la qual s'hidrolitza donant lloc a l'adducte del 4-aminofenol i al corresponent aldehid (gliceraldehid). En qualsevol cas, aquests resultats demostren la formació d'intermedis iminoquinònics àltament reactius a partir de la bioactivació del PAP, els quals, degut a la seva electrofília, podrien unir-se a macromolècules o a components cel·lulars produint efectes tòxics. Per altra banda, aquest comportament descrit per els metabòlits del PAP es podria extrapolar a derivats d'aminofenols que continguin un  $\text{CH}_2$  adjacent al grup amino.
  
- III. Incubacions del PAP en presència d'RLM i HLM donen lloc al derivat 4'-hidroxilat del PAP (**1**) confirmant la capacitat dels enzims P450 per biotransformar el PAP, tot i que la determinació dels paràmetres cinètics mostren una baixa afinitat d'aquests enzims pel substrat. Els estudis de

inhibició i incubacions amb diferents isoenzims recombinants del P450 suggereixen els enzims 2C9, 2C18, 2D6, 2C8 i 2E1 com els més actius en la biotransformació del PAP, tots amb una baixa afinitat pel substrat segons els valors dels corresponents paràmetres cinètics. Per altra banda, l'estudi de la transformació del metabòlit **1** en la iminoquinona **2** a través de la formació del corresponent adducte de glutatió **13** indica que aquest procés té lloc de manera espontània, tot i que sembla que existeix certa dependència enzimàtica en el cas de les incubacions en presència d'RLM i NADP(H). Per tant, es confirma la formació *in vitro* de la iminoquinona **2**, espècie de potencial toxicitat, a partir del metabòlit del PAP **1**.

- IV.** Estudis del metabolisme *in vitro* de la PAA, un dels contaminants presents en els lots d'L-triptòfan responsables de la SEM, demostren la seva bioactivació per part dels enzims P450 donant lloc al corresponent derivat fenòlic **16**. Aquest intermedi, d'una manera anàloga al fenol derivat del PAP **1**, s'oxida de manera espontània generant la iminoquinona **17**, la qual isomeritza i posteriorment s'hidrolitza donant lloc al 4-aminofenol i al corresponent aldehid (formilglicina). S'estableix així un nou vincle d'unió entre la SOT i la SEM, no només a través de la formació d'un metabòlit final comú de coneguda toxicitat (4-aminofenol)<sup>(61,79-82)</sup>, sinó també mitjançant la generació concomitant d'espècies carboníliques que podrien representar un factor de risc addicional<sup>(83,84)</sup>. De manera complementària, es confirma l'existència d'una via metabòlica comuna per a xenobiòtics derivats de l'anilina que continguin un CH<sub>2</sub> adjacent al nitrogen anilínic.
- V.** A partir de la síntesi dels haptens adients, s'han generat uns anticossos específics contra el PAP de manera que s'ha pogut desenvolupar un ELISA capaç de quantificar PAP en tampó PBS i en orina humana amb un límit de detecció suficient tenint en compte el contingut de PAP en els olis contaminats. A més, si considerem que la ingestió dels derivats mono- i diesterificats del PAP continguts en l'oli tòxic generaria PAP en un últim

estadi mitjançant una hidròlisi enzimàtica, i que el PAP sembla ser una molècula prou polar com per ser eliminada directament a través de l'orina, l'ELISA desenvolupat seria una eina de gran utilitat a l'hora d'analitzar mostres de teixits i/o fluids biològics d'animals que hagin ingerit prèviament l'oli tòxic model desenvolupat al nostre laboratori, una vegada es trobi un model animal que permeti estudiar la malaltia de la SOT.



**Capítol 6**  
**BIBLIOGRAFIA**





- (1) Europe, W. H. O. (2004) Toxic oil syndrome. Ten years of progress. WHO Regional Publications, World Health Organisation Regional office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- (2) Posada de la Paz, M., Philen, R. M., and Abaitua, I. (2001) Toxic Oil Syndrome: The perspective after twenty years. *Epidemiol. Rev.* 23, 231-247.
- (3) Tabuenca, J. M. (1981) Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with anilline. *Lancet* ii, 567.
- (4) Ladona, M. G., Izquierdo-Martinez, M., Posada de la Paz, M., de la Torre, R., Ampurdanés, C., Segura, J., and Sanz, E. J. (2001) Pharmacogenetic profile of xenobiotic enzyme metabolism in survivors of the Spanish toxic oil syndrome. *Environ. Health Perspect.* 109, 369-375.
- (5) Pestaña, A., and Muñoz, E. (1982) Anilides and the Spanish toxic oil syndrome [news]. *Nature* 298, 608.
- (6) Vasquez Roncero, A., Janer del Valle, C., Maestro Duran, R., and Graciani Constante, E. (1983) New aniline derivatives in cooking oils associated with toxic oil syndrome [letter]. *Lancet* 2, 1024-1025.
- (7) Abaitua-Borda, I., and Posada de la Paz, M. (1992) Clinical findings. In: toxic oil syndrome: current knowledge and future perspectives. WHO Regional Publications, European series nº 42, World Health Organisation Regional office for Europe, Copenhagen, Denmark, 26-36.
- (8) Gelpí, E., Posada de la Paz, M., Terracini, B., Abaitua, I., Gómez de la Cámara, A., Kilbourne, E. M., Lahoz, C., Nemery, B., Philen, R. M., Soldevilla, L., and Tarkowski, S. (2002) The Spanish toxic oil syndrome twenty years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ. Health Perspect.* 110, 457-464.
- (9) Ruiz-Gutiérrez, V., and Maestro-Durán, R. (1992) Lymphatic absorption of 3-phenylamino-1,2-propanediol and its esters. *Exp. Toxic. Pathol.* 44, 29-33.
- (10) Closa, D., Folch, E., Calaf, R. Abián, J. Roselló-Catafau, J., and Gelpí, E. (2002) Absorption and effects of 3-(*N*-phenylamino)-1,2-propanediol esters in relation to toxic oil syndrome. *Lipids* 36, 1125-1133.

- (11) Ladona, M. G., Bujons, J., Messeguer, A., Ampurdanés, C., Morató, A., and Corbella, J. (1999) Biotransformation and clearance of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol, a compound present in samples related in samples related to Toxic Oil Syndrome, in C57BL/6 and A/J mice. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1127-1137.
- (12) Bujons, J., Ladona, M. G., Messeguer, A., Morató, A., and Ampurdanés, C. (2001) Metabolism of (*R*)- and (*S*)-3-(phenylamino)propane-1,2-diol in C57BL/6- and A/J-strain mice. Identification of new metabolites with toxicological significance to the toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1097-1106.
- (13) Guardiola, M., and Messeguer, A. (1998) Synthesis of tritium and carbon-14 labelled linoleic acid esters of 3-phenylamino-1,2-propanediol, compounds potentially involved in the etiology of the toxic oil syndrome. *J Labelled Comp Radiopharm.* XLI, 75-80.
- (14) Wood, G. M., Slack, P. T., Rossell, J. B., Mann, P. J., and Farnell, P. J. (1994) Spanish toxic oil syndrome (1981): Progress in the identification of suspected toxic components in simulated oils. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2525-2530.
- (15) Morató, A., Escabrós, J., Manich, A., Reig, N., Castaño, Y., Abian, J., and Messeguer, A. (2005) On the generation and outcome of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol derivatives in deodorized model related to toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 665-674.
- (16) Smith, C. R. J. (1972) Glyceride Chirality, in *Topics in lipid chemistry* (Gunstone, F. D., Ed.) pp 89-124, University of St Andrews.
- (17) Hirschmann, H. (1960) The Nature of Substrate Asymmetry in Stereoselective Reactions. *J. Biol. Chem.* 235, 2762-2767.
- (18) Mattson, F. H., and Beck, L. W. (1956) The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides. *J. Biol. Chem.* 219, 735-740.
- (19) Desnuelle, P. (1961) *Advances in enzymology. Pancreatic lipase.*, Vol. 23, F. Nord, Interscience Publ., Inc., New York.
- (20) Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Doson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L.,

- Thim, L., and Menge, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 334, 767-770.
- (21) Carrière, F., Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Laugier, R., and Verger, R. (1997) In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 429-435.
- (22) Klivanov, A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241-246.
- (23) Phan, C. T., and Tso, P. (2001) Intestinal lipid absorption and transport. *Frontiers in Bioscience* 6, 299-319.
- (24) Jensen, R. G., Felice, A. D., and Clarck, R. M. (1983) Determination of lipase specificity. *Lipids* 18, 239-252.
- (25) Miller, C., Austin, H., Posorke, L., and Gonzalez, J. (1988) Characteristic of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 927-931.
- (26) Xu, X. (2000) Production of specific structured triacylglycerols by lipase catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 287-303.
- (27) Rogalska, E., Ransac, S., and Verger, R. (1990) Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.* 265, 20271-20276.
- (28) Momsen, W., and Brockman, H. (1976) Effects of colipase and taurodeoxycholate on the catalytic and physical properties of pancreatic lipase B at an oil-water interface. *J. Biol. Chem.* 251, 378-383.
- (29) Serdarevich, B. (1967) Glyceride isomerizations in lipid chemistry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 381-393.
- (30) WHO (1992) Toxic Oil Syndrome. Current knowledge and future perspectives., Copenhagen.
- (31) Gibson, G. G., and Skett, P. (1994) Introduction to drug metabolism, Blackie Academic & Professional: Exeter.
- (32) Ortiz de Montellano, P. R. (1995) Cytochrome P450. Structure, mechanism and biochemistry., 2nd Ed. Plenum press:New York.
- (33) Bessems, J. G. M., Van Stee, L. L. P., Commandeur, J. N. M., Groot, E. J., and Vermeulen, N. P. E. (1997) Cytotoxicity of paracetamol and 3,5-

dihalogenated analogues: role of cytochrom P-450 and formation of GSH conjugates and protein adducts. *Toxicol. in vitro* 11, 9-19.

- (34) Goeptar, A. R., Scheerens, H., and Vermeulen, N. P. E. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25-65.
- (35) Nelson, D. R., Kamati, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., and Nebert, D. W. (1994) The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 12, 1-51.
- (36) Guengerich, F. P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS Journal.* 8, 101-111.
- (37) Ingelman-Sundberg, M. (2001) Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol. Lett.* 120, 259-268.
- (38) Guengerich, F. P. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol. interv.* 3, 194-204.
- (39) Buckberry, L., and Teesdale, P. (2001) *Essentials of biological chemistry*, John Wiley & Sons, Sussex (UK).
- (40) Gallardo, S., del Pozo, V., Cardaba, B., de Andres, B., Martin-Orozco, E., Fernández, J. C., Tramon, P., Posada, M., Abaitua, I., and Palomino, P. (1994) Immunological basis of toxic oil syndrome (TOS). *Toxicology* 93, 289-299.
- (41) Berking, C., Hobbs, M. V., Chatelain, R., Meurer, M. and Bell, S. A. (1998) Strain-dependent cytokine profile and susceptibility to oleic acid anilide in a murine model of the toxic oil syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 222-228.
- (42) Monks, T., and Jones, D.C. (2002) The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug. Metab.* 3, 425-438.
- (43) O'Brien, P. J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 80, 1-41.

- (44) Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.*, John Wiley & Sons, Inc., Toronto.
- (45) Gray, C. J. (1971) *Enzyme-catalysed reactions*, Van Nostrand Reinhold Company, London.
- (46) Edelstein, S. J. (1973) *Introductory biochemistry*, Holde-day Inc., San Francisco.
- (47) Kilbourne, E. M. (1992) Eosinophilia-Myalgia Syndrome: coming to grips with a new illness. *Epidemiol. Rev.* 14, 16-36.
- (48) Goda, Y., Suzuki, J., Maitani, T., Yoshihira, K., Takeda, M., and Uchiyama, M. (1992) 3-Anilino-L-alanine, structural determination of UV-5, a contaminant in EMS-associated L-tryptophan samples. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2236-2238.
- (49) Hill, R. H., Caudill, S. P., Philen, R. M., Bailey, S. L., Flanders, W. D., Driskell, W. J., Kamb, M. L., Needham, L. L., and Sampson, E. J. (1993) Contaminants in L-tryptophan associated with eosinophilia-myalgia syndrome. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 134-142.
- (50) Mazure, C. M., Keita, G. P., and Blehar, M. C. (2002) *Summit on women and depression: proceedings and recommendations.* American Psychological association., Washington DC.
- (51) Mayeno, A. N., Belongia, E. A., Lin, F. Lund, S. K., and Gleich, G. J. (1992) 3-(Phenylamino)alanine, a novel aniline-derived amino acid associated with Eosinophilia-Myalgia Syndrome: a link to Toxic Oil Syndrome? *Mayo Clin. Proc.* 67, 1134-1139.
- (52) Adachi, J., Mio, T., Ueno, Y., Naito, T., Nishimura, A., Fujiwara, S., Sumino, K., and Tatsuno, Y. (1994) Identification of four metabolites of 3-(phenylamino)alanine, a constituent in L-tryptophan products implicated in eosinophilia-myalgia syndrome, in rats. *Arch. Toxicol.* 68, 500-505.
- (53) Mayeno, A. N., Benson, L. M., Naylor, S., Colberg-Beers, M., Puchalski, J. T. and Gleich, G. J. (1995) Biotransformation of 3-(phenylamino)-1,2-propanediol to 3-(phenylamino)alanine: a chemical link between toxic oil syndrome and eosinophilia-myalgia syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 911-916.

- (54) Morató, A., Martínez-Cabot, A., Escabrós, J., Bujons, J., and Messeguer, A. (2004) Studies on the toxic oil syndrome: Stereoselective hydrolysis of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol esters by human pancreatic lipase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 889-895.
- (55) Calaf, R. E., Peña, J., Paytubi, S., Blount, B. C., Posada de la Paz, M., Gelpí, E., and Abian, J. (2001) Determination of aniline derivatives in oils related to the toxic oil syndrome by atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 16, 3828-3837.
- (56) Sherry, J. (1992) The immunoassay option. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 23, 217-300.
- (57) Marco, M.-P., Gee, S., and Hammock, B. D. (1995) Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *Trends Anal. Chem.* 14, 415-425.
- (58) Oubiña, A., Ballesteros, B., Bou, P., Galve, R., Gascon, J., Iglesias, F., Sanvicens, N., and Marco, M.-P. (2000) Immunoassays for environmental analysis. Vol. 21, Amsterdam, The Netherlands.
- (59) Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., and Simon, W. (1998) *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*, Springer Verlag Iberica, Barcelona.
- (60) Eyanagi, R., Hisanari, Y., and Shigematsu, H. (1991) Studies of paracetamol/phenacetin toxicity: isolation and characterization of *p*-aminophenol-glutathione conjugate. *Xenobiotica* 21, 793-803.
- (61) Klos, C., Koob, M., Kramer, C., and Dekant, W. (1992) *p*-aminophenol nephrotoxicity: biosynthesis of toxic glutathione conjugates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115, 98-106.
- (62) Li, W., Heinze, J., and Haehnel, W. (2005) Site-specific binding of quinone to proteins through thiol addition and addition-elimination reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6140-6141.
- (63) Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F. P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414-423.

- (64) <http://www.fda.gov/cder/drug/drugInteractions/tableSubstrates.htm>.
- (65) Chang, T. K. H., Gonzalez, F. J., and Waxman, D. J. (1994) Evaluation of triacetyloendomycin,  $\alpha$ -naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 437-442.
- (66) Josephy, P. D. (2005) The Molecular Toxicology of Acetaminophen. *Drug Metab. Rev.* 37, 581-594.
- (67) Mewies, M., Basran, J., Packman, L. C., Hille, R., and Scrutton, N. S. (1997) Involvement of a flavin iminoquinone methide in the formation of 6-hydroxyflavin mononucleotide in trimethylamine dehydrogenase: a rationale for the existence of 8 $\alpha$ -methyl and C6-linked covalent flavoproteins. *Biochemistry* 36, 7162-7168.
- (68) Martínez-Cabot, A., Morató, A., and Messeguer, A. (2005) Synthesis and stability studies of the glutathione and *N*-acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-(*N*-phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1721-1728.
- (69) Raunio, H., Hakkola, J., Hukkanen, J., Lassila, A., Paivarinta, K., Pelkonen, O., Anttila, S., Piipari, R., Boobis, A., and Edwards, R. J. (1999) Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Exp. Toxicol. Pathol.* 51, 412-417.
- (70) Castell, J. V., Donato, M. T., and Gomez-Lechon, M. J. (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 189-204.
- (71) Silvestri, L., Sonzogni, L., De Silvestri, A., Gritti, C., Foti, L., Zavaglia, C., Leverì, M., Cividini, A., Mondelli, M. U., Civardi, E., and Silini, E. M. (2003) CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *Int. J. Cancer.* 104, 310-327.
- (72) Nagata, K., and Yamazoe, Y. (2002) Genetic polymorphism. *Drug Metabol. Pharmacokin.* 17, 167-189.
- (73) Santos de Oliveira, F., Leite, B. C. O., Santana de Andrade, M. V. A., and Korn, M. (2005) Determination of total aldehydes in fuel ethanol by MBTH method-sequential injection analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 87-92.

- (74) Sai Hang Ho, S., and Zhen yu, J. (2004) Determination of airborne carbonyls: comparison of a thermal desorption/ GC method with the standard DNPH/ HPLC method. *Environ. Sci. Technol.* 38, 862-870.
- (75) Pappo, D., Vartanian, M., Lang, S., and Kashman, Y. (2005) Synthesis of cyclic endiamino peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 7682-7683.
- (76) Nakazawa, T., Suzuki, T., and Ishii, M. (1997) Synthesis and characterization of  $\beta$ -O-tosyldehydroserine as a precursor of dehydroamino acids. *Tetrahedron lett.* 38, 8951-8954.
- (77) Cheung, K.-M., and Shoolingin-Jordan, P. M. (1997) Synthesis of 3-amino-3-vinyl propanoic acid and its conversion to 4-amino-5-hydroxy-4,5-dihydrofuran-2-one hydrochloride (HAD), A cyclic stabilised form of aspartate 1-semialdehyde hydrochloride. *Tetrahedron* 53, 15807-15812.
- (78) Sidransky, H., Verney, E., Cosgrove, J. W., and Latham, P. S. (1994) Effect of 3-phenylamino-L-alanine on tryptophan binding to rat hepatic nuclear envelopes. *Toxicology* 86, 135-145.
- (79) Fowler, L. M., and Lock, E. A. (1994) Nephrotoxicity of 4-amino-3-S-glutathionylphenol and its modulation by metabolism or transport inhibitors. *Arch. Toxicol.* 68, 15-23.
- (80) Lock, E. A., Cross, T. J., and Schnellmann, R. G. (1993) Studies on the mechanism of 4-aminophenol-induced toxicity to renal proximal tubules. *Human Experim. Toxicol.* 12, 383-388.
- (81) Fu, X., Chen, T. S., Ray, M. B., Nagasawa, H. T., and Williams, W. M. (2004) *p*-Aminophenol-induced hepatotoxicity in hamsters: role of glutathione. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 154-161.
- (82) Yoshida, R., Oikawa, S., Ogawa, Y., Miyakoshi, Y., Ooida, M., Asanuma, K., and Shimizu, H. (1998) Mutagenicity of *p*-aminophenol in *E. coli* WP2uvrA/pKM101 and its relevance to oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 415, 139-150.
- (83) Burcham, P. C., and Pyke, S. M. (2006) Hydralazine inhibits rapid acrolein-induced protein oligomerization: role of aldehyde scavenging and adduct trapping in cross-link blocking and cytoprotection. *Mol. Pharmacol.* 69, 1056-1065.



- (84) Long, J., Wang, X., Gao, H., Liu, Z., Liu, C., Miao, M., and Liu, J. (2006) Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Life Sci.* 79, 1466-1472.





