

**PROCESSOS PEROXIDATIUS  
EN ALGUNES MALALTIES METABÒLIQUES**

Comunicació presentada el dia 20 de març de 1962 pel doctor

**PERE PUIG I MUSET**

Director del Departament d'Investigació del Laboratori PEVYA.  
De la Secció de Farmacologia de la Facultat de Medicina  
de Barcelona

## ANTECEDENTS

El tema que pretenc d'exposar aquí és extraordinàriament dilatat, ja que va des d'aspectes estrictament teòrics i àdhuc especulatius, fins a derivacions farmacològiques i terapèutiques i, per tant, farmacèutiques.

Per aquest motiu, més que no pas fer referència a la seva totalitat, jo en vull exposar només les bases teòriques, perquè vosaltres mateixos pugueu deduir com és un tema ple de possibilitats de tot ordre i que difícilment nosaltres sols podrem abraçar en la seva totalitat.

En dir fenòmens peroxidatius ens referim a tot procés o reacció metabòlica en què *l'oxigen molecular* s'uneix a d'altres elements originant algun tipus de peròxid. I així mateix entren en aquest grup les reaccions subsegüents a la desaparició de tot peròxid.

És convenient, abans que tot, de matisar les diferències entre peroxidació i oxidació, car, si bé les oxidacions poden ésser també produïdes per l'oxigen, actualment és considerada com a oxidació tota reacció en què es produeix pèrdua de càrrega electrònica; així, el pas del ferro de ferrós ( $Fe^{**}$ ) a fèrric ( $Fe^{***}$ ), en què hi ha pèrdua d'un electró, o sia que augmenta la càrrega positiva, és una oxidació. I l'element que guanya un electró és considerat reduït.

En bioquímica, des dels estudis de WIELAND, hom considera oxidació com a sinònim de deshidrogenació, és a dir, de tota reacció en què se cedeixen o s'alliberen dos àtoms d'hidrogen. I, si bé el cos captador d'aquests hidrògens pot ésser l'oxigen, també moltes altres molècules compostes els poden acceptar.

Concretament, doncs: nosaltres ens referim exclusivament als casos en què intervé directament l'oxigen molecular i formant inicialment un tipus de peròxid.

El més elemental, alhora que més freqüent, és la formació de peròxid d'hidrogen quan és l'oxigen el que accepta dos hidrògens en un procés dehidrogenàsic.

Per tal de matisar aquests dos conceptes, PI I SUNYER Jr. proposava de diferenciar les reaccions d'*oxidació* de les d'*oxigenació* englobant en aquestes les que acabem d'assenyalar com a peroxidació. També són mencionades com a reaccions d'autooxidació, perquè en molta ocasió s'originen per si soles, és a dir, sense altre catalitzador que la presència d'oxigen molecular.

Més recentment, alguns autors americans, en referir-se a aquests processos — per exemple, en alguna hidroxilació d'esteroids — diuen «oxidacions en l'antic concepte», de pura fixació d'origen.

I és precisament perquè aquests tipus d'oxidació foren els primers estudiats — remuntant-se als descobriments de LEVOISIER — que en les últimes dècades hom els dedicà poca atenció.

En aquests moments, però, hom en redescobreix el transcendental interès. I d'entre els nombrosos camins que convergeixen en aquest tema, en destaca un per la seva rabiosa actualitat o la seva importància: el del mecanisme d'acció biològica de les radiacions ionitzants.

En efecte: si bé, per l'anomenada acció directa de les radiacions Röntgen, gamma i d'altres, podem interpretar alguna de les seves accions, per aquest sol mecanisme no en podem capir o interpretar la totalitat; en especial, les accions biològiques diferides. Neix, en conseqüència, el concepte d'acció indirecta a través de formació de peròxids i radicals lliures que permet d'explicar-se més satisfactòriament la totalitat dels fets coneguts.

Un dels punts-clau d'aquesta nova interpretació és que la mateixa irradiació, en tipus o en intensitat, actua poc o molt segons que es faci en absència o en presència d'oxigen i en proporció directa a la seva quantitat.

Entrat ja en els conceptes actuals, cal tenir en compte que l'oxigen atmosfèric que respirem, per la seva intrínseca propietat d'ésser d'estructura electrònica biradical, es presenta sempre en forma de molècules formades per la unió de dos àtoms. I que quan reacciona amb d'altres àtoms o molècules pot originar molts tipus d'unions.

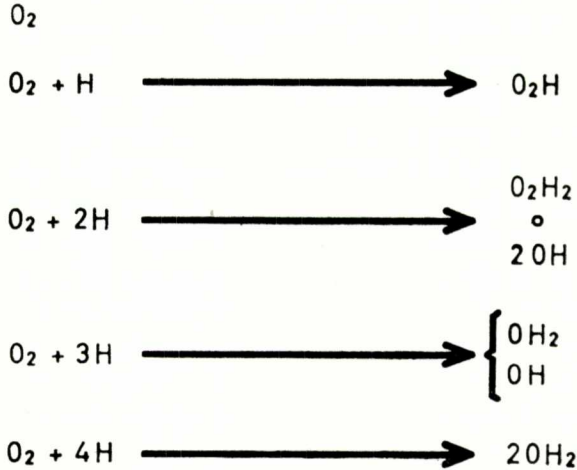
Considerant la possible unió més elemental, la que es pot produir amb l'hidrogen, existeixen les possibilitats que consignem a la taula núm. 1.

D'aquests cossos, fins no fa gaire hom només prenia en consideració l'aigua: talment hom prescindia de les altres possibilitats, que era formulada correntment de la següent manera:



que és un dels absurds químics més grans. I és que era difícil de prendre en consideració els altres cossos assenyalats perquè HO i HO<sub>2</sub> són d'es-

tractura radical, és a dir, que són electrònicament incomplets i, per tant, d'una vida real extraordinàriament curta, impossible, en les condicions ambientals, d'aïllar i de guardar com qualsevol altre compost químic d'estructura material completa. I l'altre, el peròxid d'hidrogen, és descompost a mesura que es forma per una sèrie de reaccions bioquímiques molt nom-



Taula I

broses, la més específica i més coneguda de les quals és l'enzimàtica mitjançant la catalasa.

Tanmateix, el fet que aquests peròxids es formin i malgrat que llur vida sigui extraordinàriament efímera, tant per la pròpia estructura com per les defenses biològiques contra ells, implica de poder deduir fàcilment que poden donar-se unes circumstàncies en què llur desaparició no sigui la normalment previsible. I aquí neix el motiu de les nostres especulacions primeres, experimentals després, i els treballs actuals que aquí vull exposar.

Nosaltres ens interessarem per aquest tema ja fa molts anys: tot just acabada la passada guerra civil.

En aquells dies que hom podia fer recompte de les misèries de tota lluita i penúria, a la població de Molins de Rei es diagnosticaren diversos casos d'una curiosa malaltia denominada «Latirisme», que, segons semblava, podia ésser una afecció per manca, ja que només es donava en



les persones que s'alimentaven de guixes d'una manera gairebé exclusiva.

Jo, que tenia ganes de fer quelcom d'investigació, vaig creure que seria d'interès d'estudiar el contingut de Vitamina E d'aquells llegums, ja que les notícies que llavors es divulgaven sobre aquest nou factor vitamínic era que tenia un important paper en els mecanismes neuromusculars.

Vaig aïllar l'oli de guixa, i per a poder comparar obtinguérem també oli de germen de blat, de riquesa certa en aquesta Vitamina.

Els estudis, malauradament, ens conduïren a la conclusió que la Vitamina E no tenia cap relació directa amb la gènesi de les lesions latíriques. Però jo vaig quedar totalment interessat en les accions biològiques d'aquest factor vitamínic, l'acció més fonamental del qual és l'activitat *antioxigen*, és a dir, d'actuar de defensa contra una hiperoxigenació o l'acció patògena de greixos rancis, o sia peroxidats, ja que una dieta rica en aquesta produeix ben fàcilment la simptomatologia d'una avitaminosi E.

També es coneixia la gran toxicitat de les altes concentracions d'oxigen, capaces d'induir convulsions i la mort en forta contradicció amb la seva propietat de gas vital per excel·lència.

Més que mai en aquells moments m'esperonava de poder-me dedicar a la investigació profunda d'aquests processos bioquímics. Però si en tot moment i en aquest país és difícil de dedicar-se a la investigació biològica pura, encara ho era més en aquells anys.

Per fi, algun consell decisiu em féu adonar que la posada en marxa com a producte farmacèutic de l'oli de germen de blat, que ja obtenia experimentalment, em podria permetre de treballar conjuntament en la fabricació i en la investigació tot mantenint el primer el cost del segon.

En marxa en aquest sentit, el següent tema estudiat fou el d'un altre antioxigen, les flavones de la llimona, que l'hongarès SZENT-GYORGI acabava d'anunciar com a Vitamina de la permeabilitat.

Els treballs sobre les flavones consistiren a determinar llur potència antioxigen i demostrar-nos alhora que el tema era inacabable i prenyat de sorpreses; al mateix temps, però, apreciàvem que resultava gairebé quixotesc d'encarar-se a determinar les accions d'uns cossos de vida quasi inexistent, que, com uns molins de vent, només podien existir en una imaginació exaltada. Per altra banda, era un tema del qual difícilment es trobaven estudis sistemàtics i ni tan sols treballs experimentals.

Després de dedicar més de tretze anys a estudis més factibles i d'una utilització farmacològica més immediata, a l'estiu de l'any 1954 vaig reprendre un contacte ple amb aquell primitiu tema l'interès pel qual no m'havia

totalment abandonat mai. Vaig dedicar íntegrament aquell estiu a recollir i ordenar tota la bibliografia possible sobre la constant formació a la cèl·lula viva i teixit de compostos peroxídics, tot intentant de relacionar-los amb diferents patogènesis.

Aquest recull bibliogràfic, publicat en forma de llibre amb el títol: *Los hidrometabolitos y las enfermedades de la civilización*, permeté de fixar millor les idees i de poder-les intercanviar amb d'altres.

Decidit, doncs, a treballar experimentalment amb el tema, si bé tenia alguna possibilitat d'esmerçar-hi material, aparells, hores i mà d'obra, les possibilitats no eren suficients com per a sol·licitar la importació dels primers aparells de mesura de paramagnetisme electrònic que constitueixen l'única forma de poder determinar realment la presència i la formació de radicals lliures de tipus peroxidatiu.

I aquí tinguérem la feliç idea d'atacar el problema per una part més assequible, o sia, d'atenir-nos exclusivament a una metòdica purament farmacològica. En efecte: si volíem saber quin paper és possible d'assignar a la formació de peròxids, un camí pot ésser de veure la resposta d'un organisme animal a un producte que indueix una hiperproducció d'aquests cossos.

Els peròxids coneguts, començant per l'aigua oxigenada, no era possible d'utilitzar-los, sia perquè són descompostos en el mateix moment d'injectar, o perquè llur toxicitat és tan elevada que ocasionen fenòmens no relacionables amb una hiperformació més o menys normal.

Després d'una llarga selecció considerarem un enzim poc conegut: la lipoxidasa o lipoxigenasa, descrita per primera vegada el 1934 pel francès ANDRÉ i el xinès HU. Enzim que té la propietat d'induir la formació de peròxids d'àcids grassos poliinsaturats tipus Àcid linoleic, linolènic i araquidònic — els peròxids que també poden provocar la simptomatologia de les avitaminosis E i F —.

Pel fet d'ésser aquesta formació bastant lenta, i la seva estabilitat satisfactòria, resultà un mètode adequat per a produir, mitjançant la seva administració a animals, una formació de peròxids en els propis teixits.

I en aquest ordre d'idees resultava també de bell antuvi evident que la utilització d'un enzim que específicament destrueix els peròxids que es formessin podria actuar com un control d'interès. Aquest enzim era sens dubte la catalasa.

L'obtenció d'aquests dos enzims per a treballar-hi farmacològicament resultà molt laboriosa. El primer, la lipoxidasa, perquè les seves tècniques d'obtenció conegudes, o bé eren molt rudimentàries — en el sentit que no

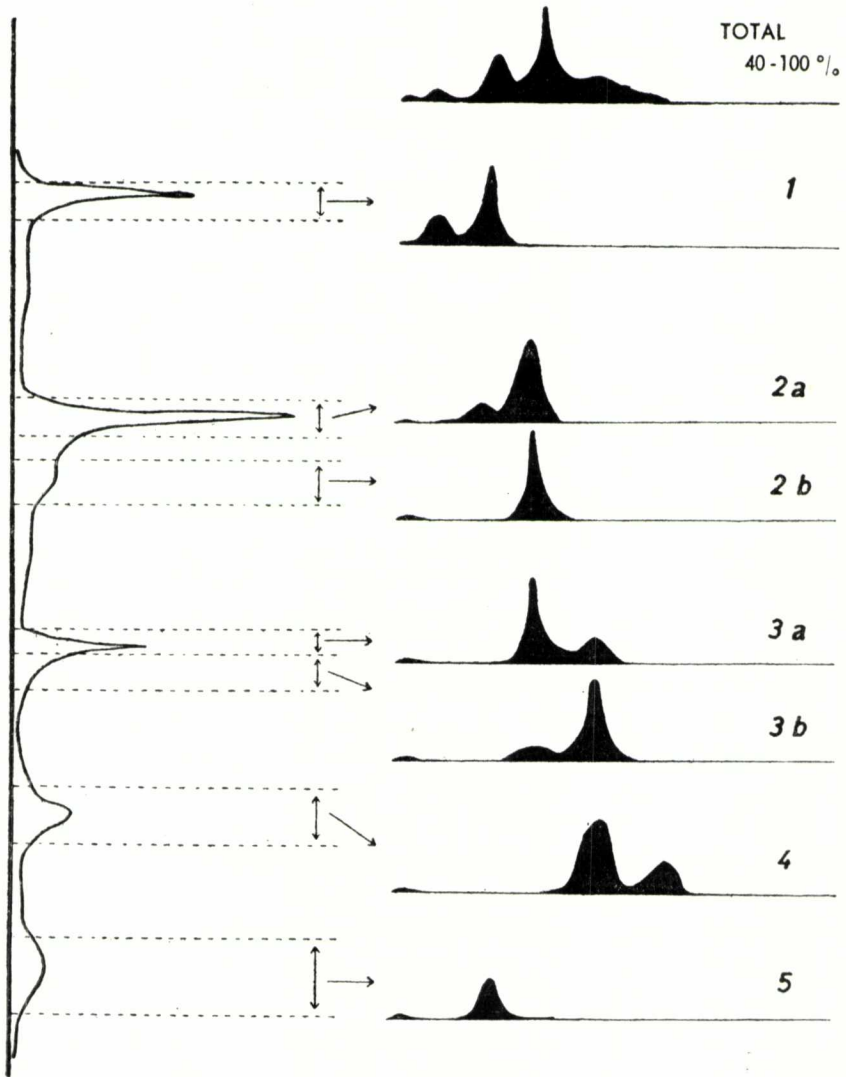


Fig. 1

fornien un producte pur —, o bé la seva obtenció puríssima tal com ho havia fet el suc THEORELL es feia mitjançant l'aparell d'electroforesi de TISELIUS, no adequat per a obtenir quantitats convenientes a l'experimentació farmacològica i terapèutica.

Nosaltres, aprofitant les tècniques més recents de la cromatografia amb columna de proteïnes —l'absorció amb cel·lulosa DEAE—, poguérem esta-

blir una metòdica capaç d'obtenir l'enzim pur i en quantitat, així com noves fraccions de la proteïna de la soja no descrites fins en aquella data. A la fig. 1, la part superior correspon a l'electroforesi de la lipoxidasa impura, i la fracció 2-b és aquesta totalment pura.

Amb l'altre enzim, la catalasa, el problema era diferent. Es coneixien bones tècniques d'obtenció, no solament pur, sinó perfectament cristallitzat, a desgrat del seu elevat pes molecular de 248.000. Però ja els primers que l'obtingueren cristallí, SUMMER i DOUNCE, publicaren en dues ocasions que aquest enzim perdia activitat en el transcurs del temps i que, a diferència de molts altres productes làbils, la seva liofilització, en lloc de garantir una activitat indefinida, en feia perdre més de la meitat en forma immediata en acabar la liofilització, i la resta, els dies subsegüents.

Un estudi detingut d'aquests fenòmens ens féu adonar que era degut al fet que la fracció proteica d'aquest enzim conté molècules d'aigua que formen part de la pròpia estructura; és a dir, aigua de constitució. I la separació d'aquesta implica no solament la inactivació enzimàtica, sinó també la desnaturalització i la insolubilització de la proteïna.

El problema així plantejat implicava de trobar un procediment mitjançant el qual hom pogués treballar amb la tècnica de liofilització, però solament fins a un determinat punt; o sia, que permetés que les molècules d'aigua constitutives quedessin en llur lloc a la proteïna. Uns, no previsiblement, breus assaigs, ens permeteren de trobar que l'addició d'un dissecàrid a l'enzim cristallí, pel seu poder higroscòpic, dificultava talment la liofilització en la seva fase final, que permetia de parar aquesta al moment precís, ja que ulteriors assaigs determinaren que l'activitat és com la dels cristalls de punt de partida, i la conservació, pràcticament il·limitada.

Aquesta petita troballa fou, això no obstant, la pedra de toc que permeté tota l'experimentació farmacològica i clínica subsegüent; troballa que, per altra part, no és altra cosa que aplicar la tècnica de conservar fruites dins una olla a base de confitura, que ja feien les nostres àvies, però adaptat a l'època actual de liofilitzacions i de vials.

Passem ara als primers resultats obtinguts.



## ELS FETS

Al costat d'investigacions *in vitro* que tingueren per objecte de demostrar llur acció enzimàtica específica, portàrem a terme diversos estudis d'ordre toxicològic. Mentre l'hepatocatalasa resultà pràcticament atòxica, tant a dosi única com en administració sostinguda, la lipoxidasa es mostrà dotada d'una toxicitat, variable segons les espècies, però especialment notable quan era administrada continuadament. Quan s'injecten rates, de primer s'observa una fase breu d'excitació seguida de somnolència. Conjuntament amb parèsia de les extremitats i diarrea.

Al cap de poques hores apareix una dispnea que s'accentua progressivament fins a la mort, si la dosi ha estat prou elevada. I l'autòpsia demostra que ha existit una veritable asfíxia produïda per una exsudació pleural.

En els animals sotmesos a dosis inferiors i continuades, passats bastants dies — un mes com a mínim —, es produeix una caiguda de pèl amb atròfia del fol·licle pilós.

El mateix fenomen, però més ràpid, es produeix per l'aplicació tòpica de la lipoxidasa quan aquesta és aplicada conjuntament amb un substrate adequat, com és l'àcid linoleic. És a dir, que resulta ben clar que el factor tòxic són els peròxids que l'enzim forma en actuar sobre àcids grassos. No pas la lipoxidasa *per se*, ja que, aplicada sola, no produeix aquells efectes.

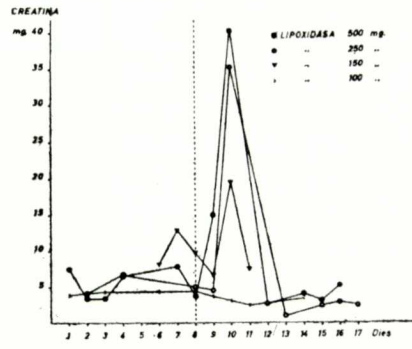
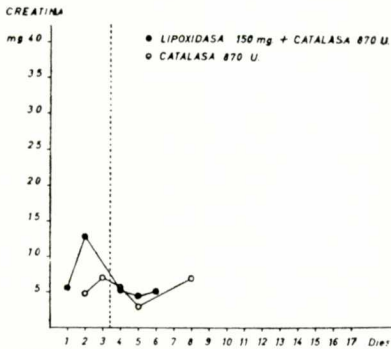
És interessant de remarcar que tota aquesta simptomatologia és produïda així mateix per les radiacions ionitzants — des de l'alopecía fins a l'alteració pulmonar —, pel qual motiu nosaltres publicàrem aquests resultats sota la designació d'«acció radiomimètica de la lipoxidasa», i ulteriors estudis i consideracions indiquen que correspon a la realitat.

Al marge de distintes citacions fetes d'aquests treballs nostres, vull mencionar-ne solament una: la del bioquímic del Medical College of St. Bartholomew's Hospital, de Londres, el Prof. E. D. WILLIS, que en el plantejament i la discussió d'un estudi seu sobre els efectes dels peròxids d'àcids grassos sobre alguns enzims diu que «les relacions entre peròxids i radiacions s'han establert des de diversos camins d'investigació: primer, perquè ha estat demostrat que es formen peròxids en els animals irradiats; segon, perquè algunes de les accions tòxiques que produeix la injecció de peròxids són semblants als efectes de les radiacions; i tercer, perquè la injecció de lipoxidasa produeix certs efectes radiomimètics».

Això darrer, segons els nostres estudis; és a dir, que hom considera aquesta aportació com un pilar d'argumentació actual.

Ens trobàvem, doncs, en un camí fructífer i prometedor de troballes. I la catalasa, al contrari de la lipoxidasa, no manifestava cap acció tòxica aparent, ni que fos administrada a dosis tan elevades com són les de 50.000 unitats/quilogram.

L'afectació de l'estat general dels animals tractats amb la lipoxidasa ens portà a estudiar algun dels compostos urinaris susceptibles d'orientar-nos sobre els processos metabòlics afectats per l'acció de l'enzim.



Figs. 2 i 3

Els nostres primers estudis versaren sobre el comportament de la creatina, l'àcid úric i els 17-hidroxicorticoides urinaris de cobais tractats amb lipoxidasa sola i amb lipoxidasa i hepatocatalasa simultàniament.

Tal com podem veure a la figura núm. 2, amb una dosi de 150 mgr. de lipoxidasa no es modifiquen notablement els límits d'excreció de creatina en el cobai. Cal arribar a dosis de 250 mgr. perquè les xifres de la creatina urinària augmentin de 6 a 8 vegades per a tornar a llurs valors normals al cap de quatre o cinc dies. Ara: quan ensems amb la lipoxidasa hom administra una dosi de 870 unitats d'hepatocatalasa, s'observa, en canvi, una lleugera disminució de l'excreció de creatina, tal com quan es dona l'HC sola (fig. 3). Fenòmens del mateix ordre s'esdevenen quant a l'excreció urinària de 17-hidroxicorticoides i d'àcid úric.

## POSSIBILITATS TERAPÈUTIQUES DE L'HEPATOCATALASA

La manca de toxicitat general d'aquest enzim i la seva indubtable acció sobre diverses reaccions metabòliques ens feren pensar en la seva possible utilització terapèutica, quan fou posat en relleu que la seva acció hipouricosúrica anava acompanyada d'una acció hipouricemiant. A partir d'aquest moment, l'acció farmacoteràpica de l'HC fou estudiada simultàniament sota els punts de vista experimental i clínic. Amb tot, per no allargar-nos, ens ocuparem solament dels treballs d'ordre experimental.

Tal com hem citat fa un moment, l'administració d'HC sola al cobai produeix una ràpida disminució de l'eliminació urinària d'àcid úric. Ara: quan en el mateix animal s'administren 1000 u/quilogram d'HC s'observa al mateix temps una disminució dels nivells hemàtics d'àcid úric que es manifesta ja al cap de 24 hores per a anar-se fent cada vegada més evident fins que arriba al màxim al cinquè dia. Resultats semblants han estat obtinguts en d'altres animals. La disminució simultània dels nivells d'àcid úric a la sang i a l'orina demostra d'una manera ben palesa que l'acció de l'HC no pot ésser comparada a la dels productes uricosúrics habitualment utilitzats en el tractament de la gota. L'acció és en aquest cas molt més complexa, i cal pensar — com veurem més endavant — que ens trobem en presència d'un procés biològic induït per l'HC.

Ben aviat aquesta acció de l'HC sobre el metabolisme de l'àcid úric fou utilitzada per BARCELÓ i SANS SOLÀ en el tractament de malalts gotosos. I fou en aquests primers malalts que en el curs dels corresponents estudis bioquímics hom posà en relleu l'evident acció de l'HC sobre el *colesterol*.

Si bé són ben conegudes les dificultats amb què hom topa per a determinar les accions experimentals sobre el metabolisme del colesterol i dels lípids en general, hem pogut comprovar que aquesta acció hipocolesterolemiant de l'HC pot ésser observada en el cobai. L'administració de l'enzim per via intraperitoneal, a la dosi de 2000 u/quilogram, produeix un remarkable descens de la colesterolèmia, posat que els seus valors inicials siguin alts. A fi de demostrar aquesta acció de l'HC sobre el metabolisme del colesterol hem seguit, de més a més, el camí habitual en l'estudi d'aquestes accions, és a dir: la provocació d'una hipercolesterolèmia per un agent tensioactiu.

Dotze conills mascles de 1700/1900 gr de pes foren injectats per via intravenosa amb una solució al 20 per 100 en sèrum fisiològic de «Tween



80», a raó de 2,5 cc per quilogram. Els animals foren aleshores dividits en dos grups de sis cada un. Mentre els del grup B servien de testimonis als del grup A, els foren administrades, per via intramuscular, injeccions de 1000 u/quilogram d'HC, una hora abans de cada una de les extraccions

*Colesterol en sang mg. 100 cc.*

	Grup A						Grup B					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Abans	38	90	50	38	68	64	44	54	36	42	42	32
1:30 h	70	144	86	82	86	144	128	118	76	112	128	86
3 h	108	164	90	86	164	160	150	132	90	144	112	122
4:30 h	76	134	76	76	152	160	128	126	72	122	112	102
6 h	82	136	60	80	144	150	120	130	86	120	116	108
8 h	95	135	88	80	124	136	118	134	88	108	88	88

Taula II

*Percentatge anterior dels valors de colesterol en sang*

	Grup A						Grup B					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Abans	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1:30 h	184	160	170	215	126	225	427	218	211	266	304	268
3 h	284	182	180	226	241	250	340	253	250	342	266	381
4:30 h	200	148	152	200	223	250	290	242	211	290	266	318
6 h	215	151	120	210	211	234	272	250	238	285	276	337
8 h	250	148	176	215	182	212	268	265	244	252	209	281

Taula III

de sang practicades successivament a tots els animals. Els resultats obtinguts han estat recollits a les taules II - III i a la fig. 4. Podem veure que en el grup control — animals tractats només amb «Tween 80» — l'augment màxim de la colesterolèmia es produí al cap de 3 hores i atenyé el 205 per 100. En canvi, en el mateix moment en el grup d'animals tractats amb «Tween 80» i HC l'augment era només del 127 per 100. Tal com podem veure a la taula IV, les diferències observades entre les dues mitjanes aritmètiques eren sempre significatives.



Hem assajat també l'acció de l'HC sobre la hipercolesterolèmia, encara més marcada i de més durada aconseguida mitjançant l'administració sostinguda de «Tween 80», tal com demostren ja els estudis de KELLNER i col. Efectivament: per aquest procediment hem observat increments mitjans de la colesterolemia en el conill de l'ordre de set i vuit vegades els valors inicials. Tal com podem veure a la fig. 5, en un altre lot de conills sotmesos

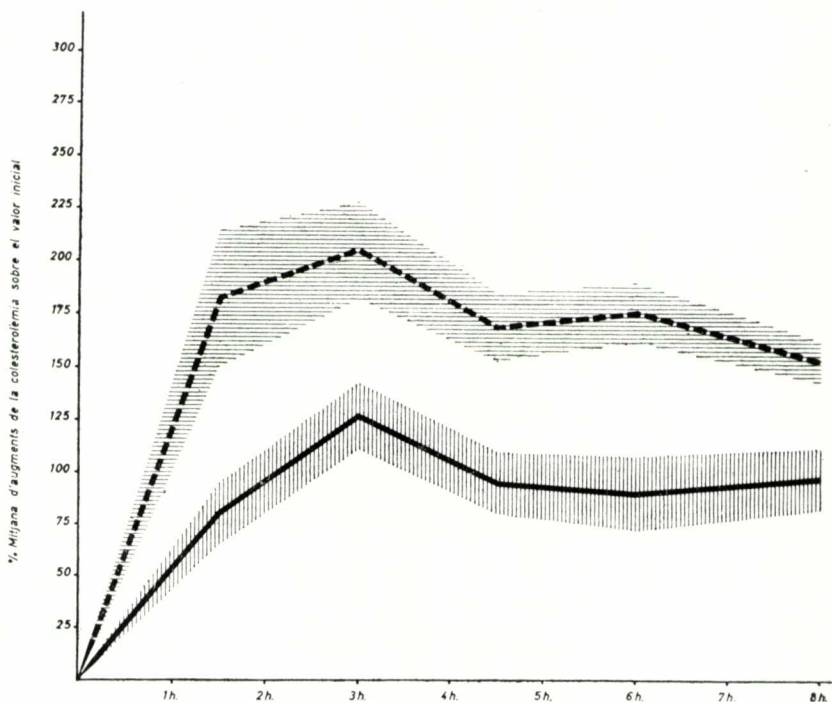


Fig. 4

al mateix ritme d'administració del detergent però tractats al mateix temps amb una injecció intramuscular diària de 2000  $\mu$ /quilogram d'HC, la hipercolesterolemia fou remarcablement més petita. Les diferències entre tots dos grups resulten encara més notables quan només hom pren en consideració els animals mascles que integraven cada un dels dos grups a raó, aproximadament, del 50 per 100.

Encara més evident resulta l'acció de l'HC sobre la hipercolesterolemia induïda per l'administració continuada de colesterol ensem amb la dieta. A la fig. 6 podem veure representats gràficament els valors mitjans de

	<i>I</i>	<i>P</i>
1:30 h	2,83	0,02 > P > 0,01
3 h	2,72	0,02 > P > 0,01
4:30 h	3,27	0,01 > P > 0,001
6 h	3,70	0,01 > P > 0,001
8 h	3,01	0,02 > P > 0,01 ✓

Taula IV

dos grups de conills que reberen la mateixa dieta. Un dels grups era tractat amb HC (1000 u, diàries per via intramuscular), mentre que l'altre servia de control.

A més, tal com podem veure a la fig. 7, el contingut en colesterol de diversos teixits (aorta, pell, cor i fetge), que, en especial els dos grups en comparació al dels animals normals, s'incrementa molt marcadament en els animals sotmesos a la sobrecàrrega amb colesterol, s'apropa molt més a les xifres normals en els conills que han estat tractats amb HC. Per altra banda, és notable, com podem veure a la mateixa figura, que

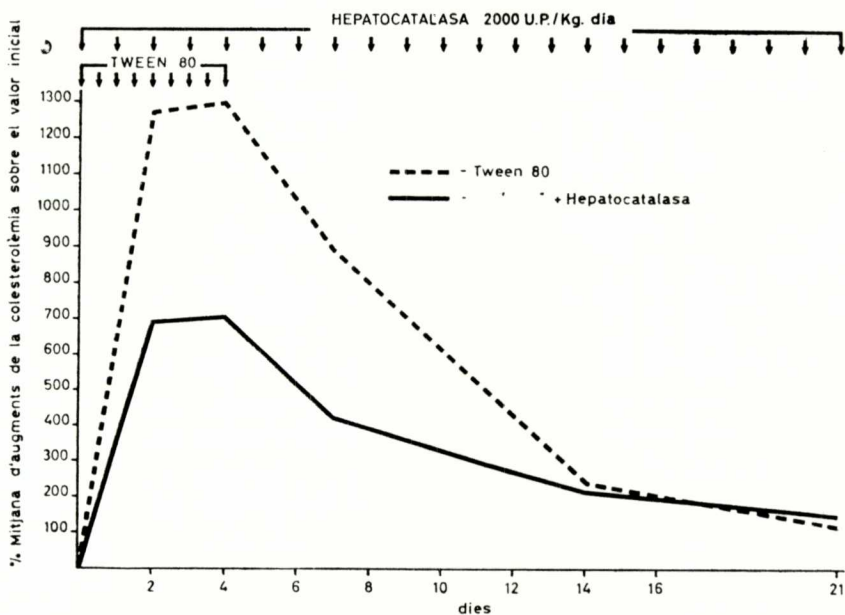


Fig. 5

aquesta tendència a la normalització no s'observa tan marcada en el fetge. Aquest fet paradoxal posa en relleu que amb l'HC no portem a cap un tractament merament substitutiu. És a dir: no és pas que l'alteració meta-

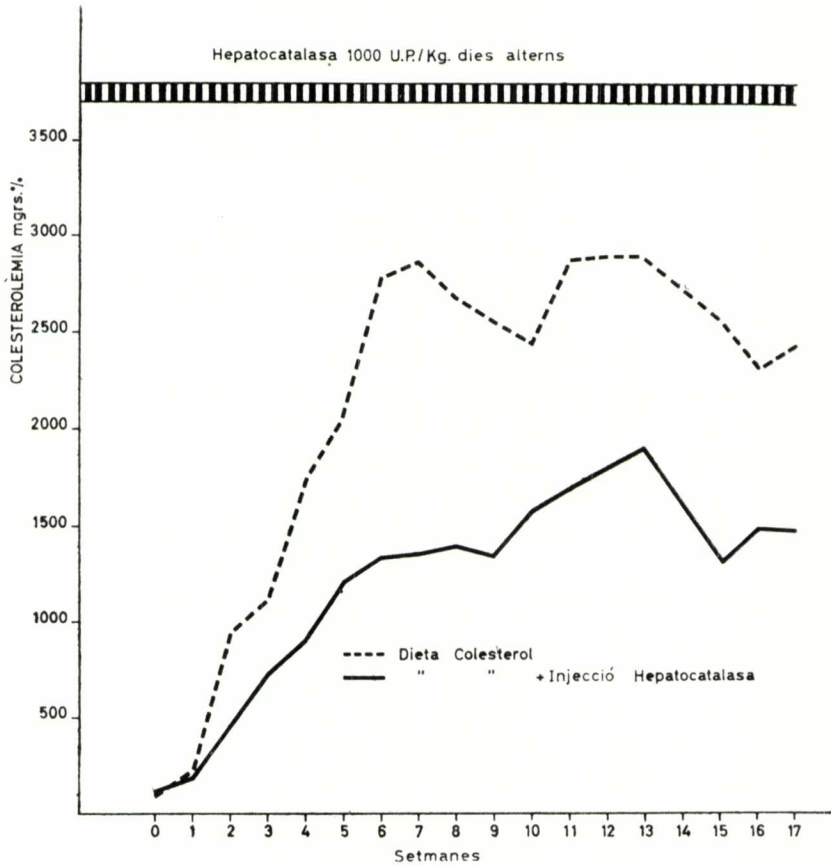


Fig. 6

bòlica a què pugui donar lloc la sobrecàrrega colesteròlica comporti un dèficit d'hepatocatalasa ni que amb l'administració d'aquest enzim corregim aquest dèficit. En realitat, aprofitem de l'HC una acció verament farmacològica — relacionada segurament, com veurem més endavant, amb la seva capacitat peroxidativa — de la mateixa manera que com tantes vegades utilitzem en Terapèutica determinades hormones o vitamines, no pas per a corregir un estat carencial, ans per a aprofitar-ne accions que a les dosis fisiològiques habituals no es posen en relleu.

En una altra sèrie d'estudis experimentals, hem investigat l'acció de l'HC sobre el *colagen*. En efecte: en diversos treballs hom ha relacionat la influència exercida pels peròxids sobre la formació del granuloma expe-

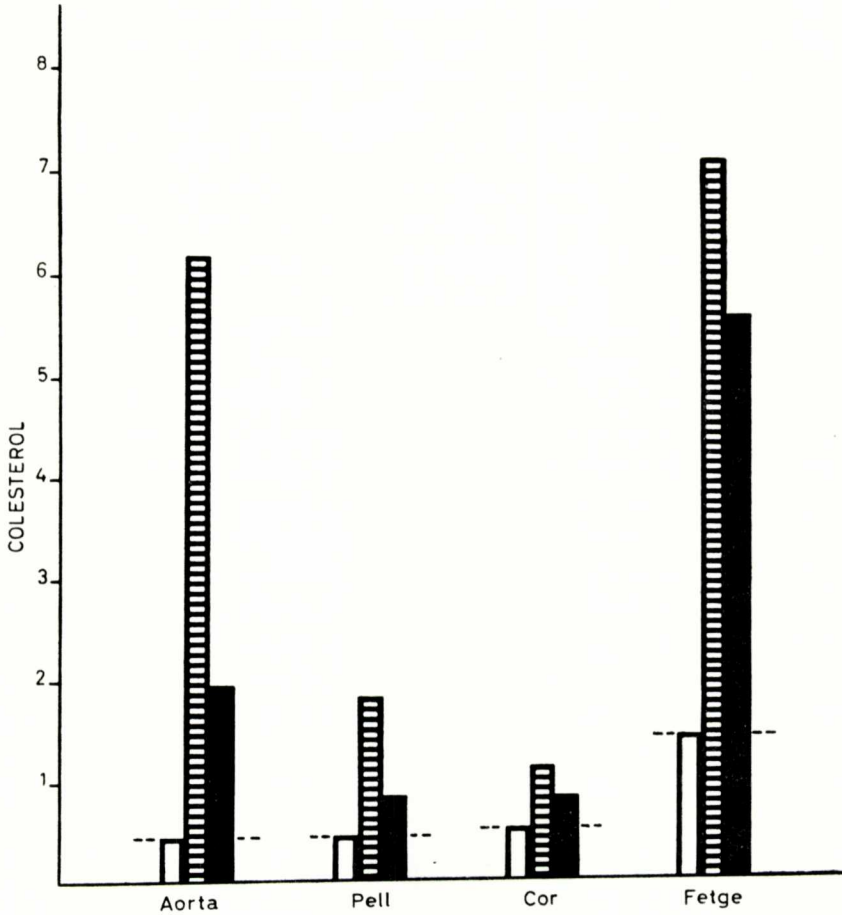


Fig. 7

rimental. Nosaltres hem estudiat aquest fenomen en la rata, a la qual, per provocar el granuloma, hem empeltat fragments d'esponja de polivinil («Moltopren Bayer»), seguint la tècnica descrita per BUCEC i NOBLE. Els resultats obtinguts fins ara ens indiquen que la formació de colagen disminueix per l'HC. Per mitjà de l'estudi histològic de les preparacions podem veure, de més a més, que en els granulomes dels animals controls es troben



els *fibroblasts* carregats amb molt de material lipòidic, mentre que en les rates tractades amb HC amb prou feines hi ha lipoides.

En els mateixos conills sotmesos a una sobrecàrrega colesteròlica als quals abans ens hem referit, hom observa que, en els tractats amb HC, ultra les diferències quant al contingut en colesterol, hi ha una disminució en la quantitat de colagen acumulada en determinats teixits com són l'aorta i la pell. En d'altres — com el cor, el fetge i el pulmó — les diferències no són remarcables.

També ens podríem estendre en la relació de les dades que en terapèutica clínica ens confirmen en forma reiterada els resultats experimentals que acabo de referir; però jo vull defugir una exposició de propietats terapèutiques.

Solament en honor a la veritat haig de mostrar que en alguns fets importants l'observació clínica ha anat més ràpida que no pas l'experimentació animal.

Així, el cas de l'observació d'una acció hipocolesterolemiant fou apreciat en el curs del tractament de malalts gotosos pels doctors Barceló i Sans Solà, que d'una manera sistemàtica feien determinar aquesta xifra ensems amb la de la uricèmia.

I a París, a l'Institut d'Investigacions sobre Arteriosclerosi de l'Hôpital Saint-Antoine, el Prof. Lemaire, ensems amb els doctors Cottet i Cloarec, amb les tècniques per ells establertes per a determinar les alteracions lipídiques en els malalts amb arteriosclerosi, estableix per primera vegada l'activitat de l'hepatocatalasa en la normalització dels cenapses lipidoproteics per a extracció mitjançant tricoloritilè, així com de les lipoproteïnes per electroforesi i dels lípids totals i reaccions de Kunkel i de Burstein.

Així mateix, aquí a Barcelona, a l'Escola Cardiològica del professor Gibert Queraltó, els doctors Balaguer Vintró, Torner i Caselles demostren que, a més d'una acció sobre els components lipídics augmentats, es manifesta una acció sobre els factors de la coagulació sanguínia de no menys d'interès.

Dades que cal consignar en aquesta comunicació, ja que realment són observacions primeres o experimentals en el tema.

Passem ara a l'última part, o sia a l'intent d'interpretació dels fets trobats, és a dir: a assenyalat les possibilitats de:

## LA HIPERPEROXIDACIÓ COM A FACTOR PATOGENÈTIC

Amb aquest sentit el raonament inicial és ben simple. Si la incrementació de formació de peròxids, obtinguda mitjançant la lipoxidasa, produeix uns dismetabolismes que l'administració d'hepatocatalasa inhibeix en gran part, en les altres accions que, experimentalment o clínicament, s'obtenen amb aquest enzim, lògicament ha d'existir una hiperformació de peròxids.

Per altra part, fins a la data no ha estat descrita cap acció bioquímica de la catalasa que estigui deslligada de la formació o de la destrucció de peròxids.

Passem, doncs, a raonar breument aquesta deducció prèvia.

En el metabolisme de l'àcid úric en l'home, des de fa molts anys és tema de discussió si existeix o no una uricolisi. Alguns estudis han demostrat que això és cert, però d'altres, basant-se principalment en el fet que no ha estat mai possible de detectar l'enzim uricàs, que fàcilment es troba en molts animals, han negat l'existència de la tal uricolisi, o intenten de donar poc valor a les determinacions que en aquest sentit s'han fet mitjançant la precisa tècnica dels isòtops radioactius.

Per altra part, però, estudis purament bioquímics *in vitro* de diferents escoles coincideixen a determinar que alguns enzims peroxidatius són capaços de produir la degradació molecular de l'àcid úric. D'aquests, els més interessants són els de Canellakis, que, comparant l'acció de diversos enzims (citocrom oxidasa, uricasa, peroxidasa, lactoperoxidasa i catalasa), observen que actuant en presència de peròxid d'etil, la catalasa és l'enzim que produeix una transformació més intensa de l'àcid úric, ja que a partir d'ell es formen els següents: alantoina, àcid oxònic, àcid cianúric, àcid paravànic, àcid oxalúric, carbonil-diurea, oxalil-diurea i urea.

Realment, aquests antecedents ja poden semblar prou interessants per a capir l'acció *in vivo* que nosaltres observem per a la injecció de catalasa. Però encara hi ha més.

En la biosíntesi de les purines, és a dir, dels precursors obligats de l'àcid úric, existeix una primera fase estretament dependent d'un procés peroxidatiu. Ens referim a l'existència de l'anomenat «metabolisme a un carboni», en el qual el carboni de l'àcid fòrmic passa a formar part de tres carbonis de les purines, dos d'ells en els carbonis 8 i 2 directament, i l'altre en el carboni 5, prèvia formació de glicina. Doncs bé: l'existència en major o menor quantitat d'àcid fòrmic o «formate», segons estesa terminologia

anglosaxona, és funció directa de l'acció conjunta d'un peròxid i de la catalasa el fet que sigui o no degradat fins a anhídrid carbònic, en una acció típica de peroxidació segons assenyalaren ja fa anys NAKADA i WEINHOUSE, i, més endavant, RAPPAPORT, i recentment confirmat per AEBI i molts d'altres.

La presència, doncs, de catalasa pot evitar una hiperformació de purines i de tants altres cossos disminuint la presència de formiat, pedra fonamental de la seva biosíntesi.

Decidir per quin d'aquests dos mecanismes actua la catalasa quan, injectada a un animal, produeix una hipouricèmia és molt arriscat. D'antuvi nosaltres creguérem que solament es produïa uricolisi; tot seguit, però, acceptàrem que a favor de la segona hipòtesi hi ha el fet que l'acció de la catalasa, tant en l'experimentació animal com en la clínica, no és mai immediata; la qual cosa pot explicar-se per una inhibició de la seva síntesi.

Tanmateix, sigui quina sigui la seva interpretació precisa, el fet és que el metabolisme de l'àcid úric ens apareix en tots els aspectes lligat a processos peroxidatius. I és precisament aquest punt el que nosaltres volem subratllar, ja que considerem que té fins i tot més valor que la mateixa acció terapèutica que li serveix de base, com molt encertadament féu ressaltar el professor americà TALBOT, en el recent Congrés de Reumatologia de Roma, en glossar la comunicació que hi llegí el doctor BARCELÓ.

I per acabar volem ara referir-nos als fets que advoquen a favor d'un dismetabolisme peroxidatiu en la gènesi de les alteracions que condueixen a l'ateromatosi.

L'ateroma, com és ben conegut, no és fàcilment atribuïble a una sola alteració metabòlica. L'existència en l'ateroma de colesterol, lípids, lipoperòxids i calci, així com destrucció de mucopolisacàrids de la paret arterial, augment de colagen en aquesta, de fibrinogen, etc., ha fet que apareguessin una infinitat de teories d'allò més enginyoses o apassionades, per a demostrar de totes aquestes alteracions quina és la causal, en el sentit de primària, i de la qual les altres serien purament fets secundaris o correlatius.

I la polèmica continua. Nosaltres, sense creure que puguem aportar una solució a un tal problema, volem ressaltar en forma esquemàtica, des del punt de vista d'unes possibles accions peroxidatives, els fets següents:

En la biosíntesi del colesterol hi ha dues etapes ben delimitades: la primera, des de l'acetat fins a l'esqualè, que es produeix en un medi estrictament anaerobi, és a dir, sense presència d'oxigen molecular; i la segona, des de la ciclització de l'esqualè fins al colesterol, i d'aquest cap als àcids



biliars o esteroïds hormonals que necessàriament han de produir-se en presència d'oxigen atmosfèric o molecular.

El mecanisme de ciclització de l'esqualè, establert fa pocs anys per l'escola americana de KONRAD BLOCH i l'anglesa de POPJAC, i confirmada per molts d'altres, és un exemple magnífic de com un radical peroxidatiu, l'hidroxil (com a radical i no com a ió), pot determinar, com una vareta màgica, la formació de l'estructura fenantrènica que de bell antuvi té l'aparença d'una estructura capriciosa i complicada. L'aproximació del radical OH per la seva electrofilia determina que l'electró que ressona entre el doble enllaç primer de l'esqualè es desplaci per unir-se a l'hidroxil; això implica que l'electró del doble enllaç següent sigui també desplaçat cap a la part que ha quedat electrofílica, i així es produeixi el tancament de la primera anella. I subsegüentment, com en un castell de cartes, es van tancant les altres fins a arribar en un cos anomenat euphol, el qual, després d'un rearranjament de càrregues electròniques, origina el lanosterol i, d'aquest, el colesterol i altres derivats polihidroxilats.

En resum: per tal que es formi colesterol han de donar-se dues circumstàncies alhora: presència d'un metabolisme fins a l'esqualè i presència d'un «petit» peròxid. Si falta un d'ells —encara que aquest últim sigui d'aparença i de volum tan mínims—, el colesterol no s'origina. I sobre aquest punt els treballs confirmatius se succeeixen ininterrompudament aquests dies.

Ja tenim, doncs, una possibilitat per a comprendre l'actuació catalàsica que consistiria a evitar una hiperpresència del radical peroxidatiu. I amb aquest mateix raonament hom fa ressaltar que metabolisme de colesterol i metabolisme peroxidatiu poden anar plegats.

Proseguim ara cap als altres constituents de l'ateroma.

Els lipoperòxids, la presència dels quals fa temps fou indicada per DAM en aquestes lesions, i recentment relacionada en llur gènesi per NISHITA i KUMEROV, ja per definició pròpia són lípids poliinstaurats en els quals s'ha fixat un peròxid a llur molècula. Per tant, no cal insistir en el fet que llur origen és dependent d'una peroxidació.

De la hiperformació de colagen a la zona subendotial, és possible de parlar-ne hores i més hores...; aquí, però, només farem ressaltar el fet següent: l'aminoàcid més característic de la molècula de colagen és la hidroxiprolina, la qual, ensems amb la prolina i la glicina, constitueix gairebé la meitat dels seus aminoàcids i li dona la seva peculiar estructura macromolecular ben coneguda.



Doncs bé: la formació d'aquesta estructura només es produeix al precís moment que part de la prolina passa a hidroxiprolina, i la lisina, a hidroxilisina. És a dir: són unes hidroxilacions les que condicionen la colagenogènesi. Per tant, aquí resulten igualment vàlids els raonaments que acabem de fer en els dos punts anteriors.

Existeixen proves experimentals molt demostratives d'aquesta interrelació peròxids-colagen, tant pels estudis *in vitro* de KALIANKAR i de MARASAS, que per l'acció de peròxid d'hidrogen s'origina hidroxiprolina a partir de prolina, hidroxilisina a partir de lisina, i glicina a partir de beta-alanina, com pels estudis de WORSTEIN i d'altres en què la hiperformació de colagen en el granuloma experimental va paral·lelament lligada a una hiperactivitat dels enzims de peroxidació (catalasa i peroxidasa); punt, aquest darrer, que es relaciona directament amb les nostres experiències sobre el granuloma que hem esmentat al principi.

Passem ara, per abreujar, a l'últim component a què volem referir-nos: el calci. És cosa ben coneguda que aquest element es troba augmentat amb moltes afeccions, especialment en l'ateromatosi. Però és relativament poc sabut que es troba sempre en la forma d'hidroxilapatita, segons els estudis realitzats recentment mitjançant l'examen röntgenogràfic. En dir que «sempre» es troba en aquest estat ens referim al fet que això no solament és vàlid per la seva presència en els ossos i els cartílags, sinó també en tota calcificació hística per patògena o passatgera que sigui. Només hi ha una excepció: en la dent la seva estructura correspon a fluorapatita.

I aquí ve el punt a remarcar: així com en referir-nos a l'estructura mineral de la dent hom no deixa mai de mencionar que és constituït per calci, fòsfats i *fluor*, és a dir, la fluorapatita, difícilment hom presta atenció al fet que el paper tan característic i important d'aquest halogen en les altres estructures càlciques és simplement substituït pel grup hidroxil, al qual correspon, naturalment, d'assignar la mateixa importància que hom no regateja al fluor i del qual electrònicament és isòster.

En la representació cristal·logràfica d'aquestes estructures, els suecs ENGSTROM i CARLSON, així com l'americà GLIMCHER i d'altres, destaquen com són *precisament* l'hidroxil o el fluor els components que determinen o imposen la disposició de la totalitat de les altres molècules en la forma cristal·lina de l'apatita.

Tenim, doncs, altra vegada uns hidroxils com a condicionadors d'un important component de l'ateroma. Ara: així com en els altres casos és fàcil de trobar experiències que demostren complidament el significat-clau

de l'hidroxil — bioquímicament i fisiològicament — respecte a l'hidroxil de les apatites, els estudis antics són gairebé tots de tipus purament químic, i entre els recents tampoc no són abundants els que relacionen la presència dels hidroxils com a conseqüència d'unes possibles hidroxilacions a tenir en compte en la patogènia de les discalcèmies.

Per tal de resumir tot això que acabem d'exposar presentem l'adjunt esquema, en el qual hom pot apreciar que en els tan importants components

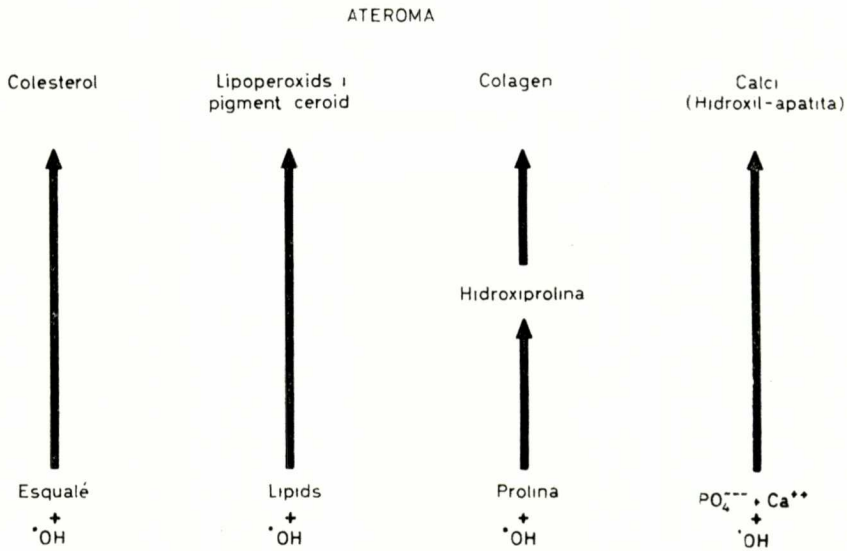


Fig. 8

de l'ateroma, com són colesterol, lipoperòxids, colagen i calci, en tots ells pot existir un factor d'hiperperoxidació que origini o condoni les hidroxilacions necessàries per a la seva gènesi (fig. 8).

Aquest factor comú no desdiu en cap manera de tot el que es refereix a l'aspecte clínic, ja que amb bases bioquímiques o sense elles els clínics ja fa molts anys que consideren tots aquests cossos com lligats per un nexa comú.

Per altra banda, les interrelacions entre augment d'àcid úric i colesterol que havien estat objecte d'atenció mèdica, sota el concepte ja abandonat d'artrisme, actualment prenen nova força de resultes de les dades aportades per diversos investigadors en el sentit que és molt més freqüent llur increment comú. DREYFUS i altres diuen taxativament que mitjançant

l'estudi estadístic s'assenyala com a més important en l'infart de miocardi la hiperuricèmia que no pas la hipercolesterolèmia, i així, tants d'altres.

Repetim, doncs, que dels nostres estudis, si bé llur aspecte farmacològic i terapèutic té sens dubte interès, encara en té més el motiu de llur origen, o sia les possibilitats cap a unes noves concepcions de patogènesi bioquímica basades en trastorns de l'activitat metabòlica en uns processos peroxidatius que fins ara havien rebut molt poca atenció.

Si he assolit d'interessar algú en aquests nous camins, em consideraré totalment satisfet.