



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

“HIPÒXIA HIPOBÀRICA
INTERMITENT: APORTACIÓ PERIFÈRICA D’OXIGEN I
INDICADORS DEL METABOLISME MUSCULAR”

Memòria presentada per **Pere Panisello Tafalla** per optar al Grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ginés Viscor i Carrasco i del Dr. Joan Ramon Torrella i Guió del Departament de Fisiologia de Biologia. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa Fisiologia (Bienni 2001-2003)

Ginés Viscor i Carrasco

Joan Ramon Torrella i Guió

Pere Panisello i Tafalla

Barcelona, 2006

3 MATERIALS i MÈTODES

*“L’èxit no s’aconsegueix amb qualitats
especials. És sobretot un treball de
constància, de mètode i d’organització”.*

J.P. Sergent.

3.1 Animals, estabulació, protocol

3.1.1 Animals d'experimentació

Els animals d'experimentació utilitzats en aquesta tesi foren rates de la soca Sprague-Dawley (n=58), de sexe masculí, d'una edat de 6 setmanes a l'inici de l'experiment i amb un pes mig inicial de $298 \pm 27,30$ g (mitjana \pm desviació estàndard).

Aquests es distribuïren atzarosament en 4 grups d'estudi diferents:

Grups de l'Estudi		Nombre animals "n"	Pes corporal Mitjana (g) \pm Desv. Std	Total	
				"n"	Pes corporal Mitjana (g) \pm Desv. Std
Control	1	7	302 \pm 13,42	19	303 \pm 22,97
	2	8	311 \pm 31,10		
	3	4	290 \pm 16,85		
Experimental	Hipòxic	17	289 \pm 33,82	39	295 \pm 28,06
	Post20 _d	16	303 \pm 23,12		
	Post40 _d	6	290 \pm 16,81		
Control + Experimentals				58	298 \pm 27,30

a) **Grups Experimentals:** Animals exposats a hipòxia hipobàrica intermitent (el procediment s'explica més detalladament en l'apartat 3.1.3 "*Protocol Experimental*" pàg. 69). Aquest grup a la seva vegada es dividí aleatòriament en 3 subgrups, depenent del moment d'extracció de les mostres:

a.1) *Grup Hipòxic.* Els animals foren sacrificats per a l'obtenció de les mostres just al finalitzar el període d'exposició a hipòxia intermitent en la cambra hipobàrica (22 dies).

a.2) Grup Post20_d. Als animals se'ls van extreure les mostres 20 dies després de finalitzar les sessions d'acimatació a la hipòxia.

a.3) Grup Post40_d. Els animals es sacrificaren 20 dies després del grup Post20_d. És a dir, 40 dies després de finalitzar l'exposició a la hipòxia hipobàrica intermitent (Fig. 3.1).

Aquests períodes (20 i 40 dies després de l'exposició a la hipòxia) es deixaren per poder observar la tendència i evolució dels possibles canvis, a mitjà i llarg termini, i si aquests es mantenien estables al llarg del temps.

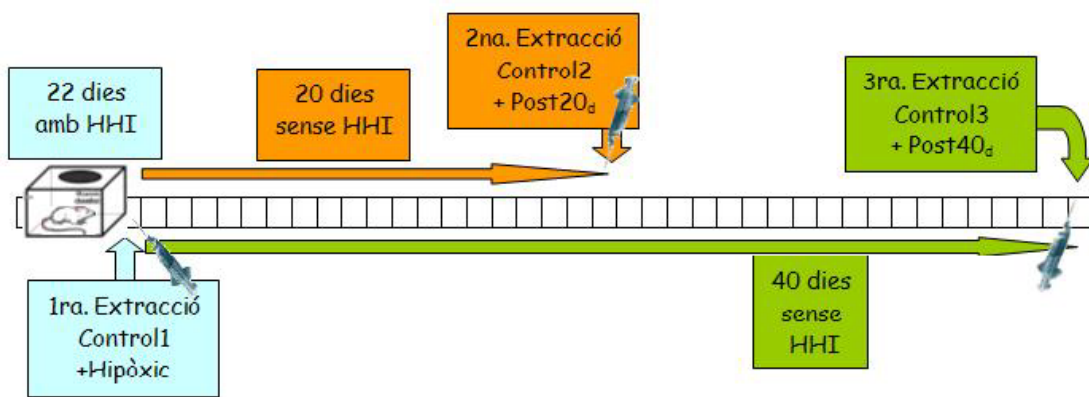


Figura 3.1. Esquema del protocol seguit en l'extracció de les mostres dels diferents grups d'animals d'experimentació. Als grups Control 1 i Hipòxic es van extreure les mostres just acabar el programa d'exposició a HHI. Als grups Control 2 i Post20_d se'ls hi van extreure 20 dies després d'acabar el protocol d'exposició. I finalment, les mostres dels grups Control 3 i Post40_d es van extreure 40 dies després de finalitzar la HHI.

- b) **Grup Control:** Animals sense cap tipus de tractament experimental. Estabulats en la mateixa sala i en les mateixes condicions que els animals del grup experimental (com s'explica més endavant). En un principi es varen establir 3 grups controls. El control 1 es compararia amb el grup Hipòxic. El control 2 es relacionaria amb el grup Post20_d. Finalment, el Control 3 es confrontaria amb el grup Post40_d. Aquest disseny ens permetria salvar possibles diferències degudes al transcurs del temps. Degut a que no es van apreciar diferències significatives entre el tres subgrups control 1, 2 i 3, es presenten com un sol grup: Control (n= 19).

3.1.2 Condicions de l'estabulació

Els animals es mantingueren en l'estabulari de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona durant 15 dies degut a l'obligada quarantena. Després d'aquest temps foren traslladats a la sala d'experimentació, on tindria lloc l'aclimatació, del Departament de Fisiologia Animal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (UB) sota control del Servei d'Estabulari de la Divisió III i el Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB i amb autorització 1899 del Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (Veure annex 1: "Autorització procediment d'experimentació animal", de la Generalitat de Catalunya"). Abans de començar les aclimatacions van estar 5 dies a la sala d'experimentació (on hi havia la cambra hipobàrica i tindrien lloc les exposicions) sense cap tipus de tractament, per tal d'habituar-se a les noves condicions ambientals (sorolls, temperatura, humitat, etc.).

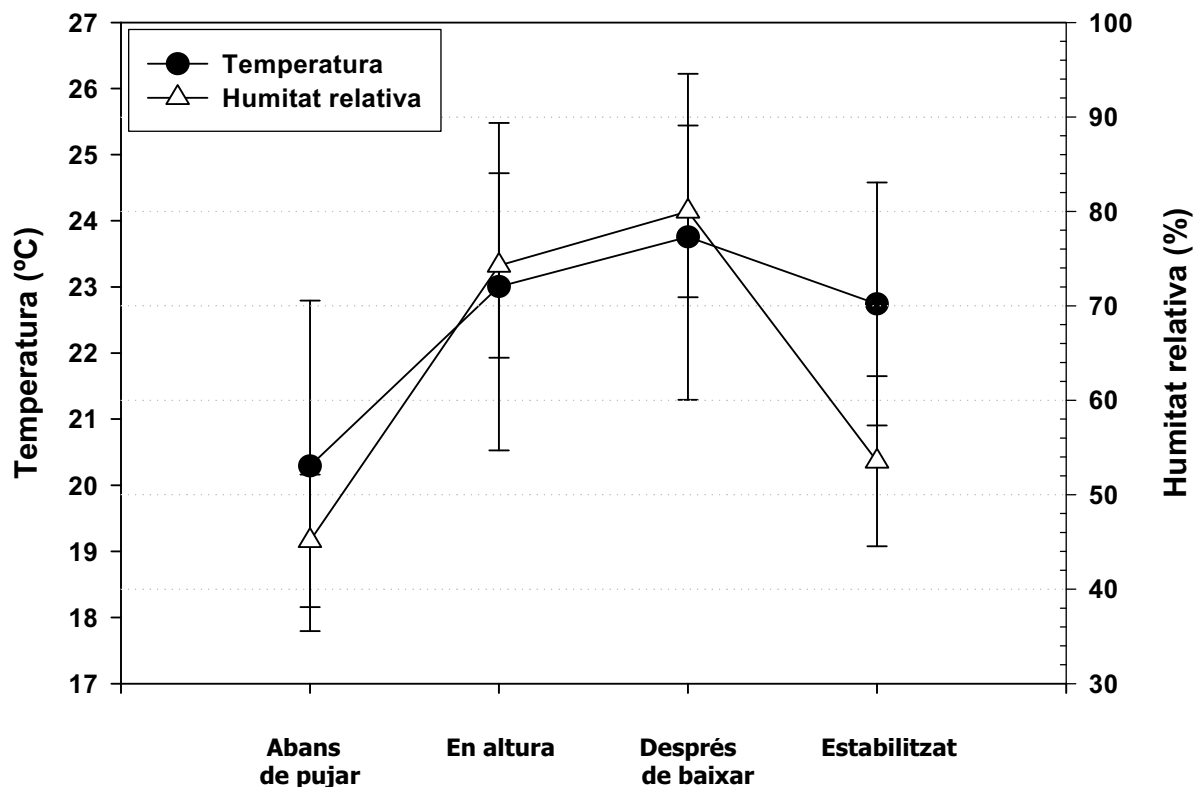


Figura 3.2. Gràfica resum corresponent a les diferents temperatures i humitats relatives durant les sessions d'aclimatació.

La temperatura de l'habitació es mantingué entre 18-24°C, amb una humitat relativa de l'aire entre 45-50%. D'aquesta manera, les condicions climàtiques es van mantenir dins de l'interval òptim de supervivència d'aquests animals (Zuñiga et al., 2001). En les sessions d'aclimatació les condicions ambientals variaven degut a la hipòxia i al tancament hermètic de la cambra experimental (Fig. 3.2).

En tot moment els animals tingueren menjar i beguda "ad libitum", excepte durant les sessions d'aclimatació (4 hores/dia), en que no disposaven d'aigua. Aquest fet es donà tant en els animals experimentals com en els controls. L'aigua que bevien era la d'ús corrent de la ciutat de Barcelona (AGBAR, Aigües de Barcelona).

El menjar subministrat fou pinso pel·letitzat comercial (Dieta de manteniment-A04. Panlab s.l.) per a rosegadors subministrat per l'estabulari de la Facultat de Biologia (UB). Aquest pinso, apart de l'aportació nutritiva necessària, també permet conservar la funció rosegadora dels nostres animals experimentals.

Les gàbies on es mantingueren els animals tenien les mesures recomanades (Zuñiga et al., 2001), tant amb amplada (27 cm), longitud (50 cm) i altura (14 cm). No es confinaven més de 3 animals per gàbia, assegurant d'aquesta manera l'espai mínim vital òptim de 250 cm² per animal.

Les gàbies i les virutes es canviaven diàriament i al menys, un cop durant el cap de setmana, conservant d'aquesta manera la mínima higiene necessària.

Els animals varen estar exposats al fotoperíode artificial de 12 hores llum-12 hores fosc.

Cada dia s'examinaven tots els animals per a la detecció de possibles ferides (per automutilació, baralles, etc.). Com també la ingestió, el consum d'aigua, la quantitat i qualitat de la femta i el pelatge. D'aquesta manera ens podíem haver adonat de possibles anomalies en l'etologia i/o problemes de l'aparell digestiu dels animals. No ha haver-hi cap incidència remarcable.

Tots els protocols realitzats en els nostres estudis foren aprovats pel comitè ètic d'experimentació Animal de la U.B. (Veure annex 2: "Autorització procediment d'experimentació animal", del Comitè Ètic de la UB") i els animals emprats reberen un tracte humanitari, d'acord amb els principis de tracte de laboratori i les lleis actuals de Protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques:

Diario Oficial de la CEE (86/609/CEE)

Boletín Oficial del Estado (BOE) nº67 del 18.03.1988

Real Decreto 223/1988, Orden 28.11.1988

Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya (DOGC) 2073 del 10.07.1995

3.1.3 Protocol experimental

L'exposició a hipòxia hipobàrica intermitent consistí en sessions d'aclimatacions de 4 hores per dia (de 9:00 a 13:00 hores), 5 dies a la setmana (de dilluns a divendres), durant 4 setmanes més 2 dies. Per tant, els animals experimentals varen estar exposats a hipòxia hipobàrica intermitent **22 dies**, amb un total de **88 hores**.

En les sessions d'aclimatació la cambra hipobàrica assolí una pressió interna de 405 mmHg, corresponents a una altitud simulada de 5.000 metres (Fig. 3.3). Es va escollir aquesta altitud pensant en poder aprofitar la màxima hipòxia possible, però sense oblidar que a partir de 5.500 metres s'han descrit problemes o alteracions neurals (Milledge, 2003).

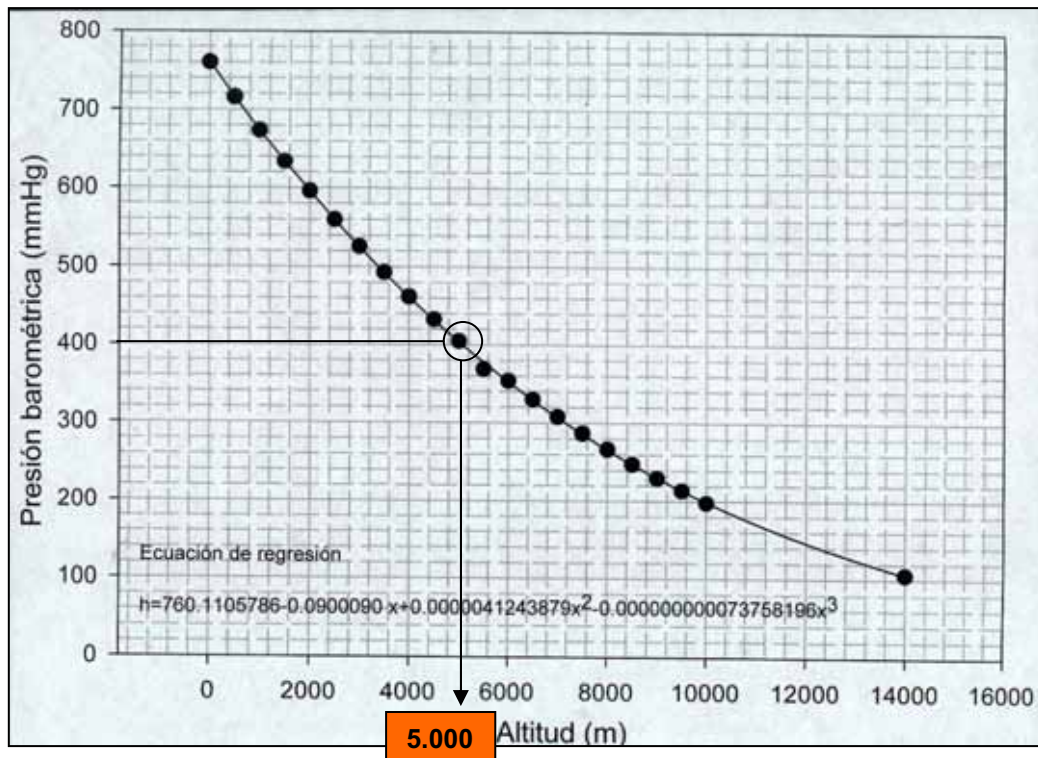



Figura 3.3. Relació entre la Pressió Baromètrica i l'altitud simulada.

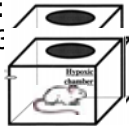
Transcorren aproximadament 20 minuts abans d'assolir la pressió desitjada (405 mmHg) i per tal de tornar al "nivell del mar" (aproximadament 760 mmHg) després de les 4 hores d'aclimatació per sessió. Aquest temps prudencial és necessari per tal de no provocar un xoc o una situació d'estrès, degut a un canvi de pressió i de condicions ambientals massa sobtat.

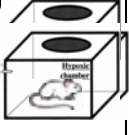
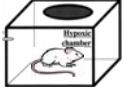
Es pesaren els animals en diferents fases de l'experiment (inici, meitat, final, dies 1, 15, 30, 50 i 71) per detectar possibles alteracions en el patró de creixement dels diferents grups i per conèixer els pesos dels animals, així com els pesos absoluts de les mostres i els pesos relatius respecte al seu pes corporal.

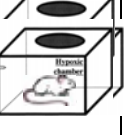
Es realitzaren 3 programes d'aclimatació idèntics però espaiats en els temps i amb diferents animals, degut a la limitació física d'espai de la cambra hipobàrica. La primera acimatació tingué lloc del 20 de gener al 18 febrer de 2002. La segona del 3 gener al 2 febrer de 2005 i finalment, la tercera acimatació del 18 maig al 8 juny de 2005.

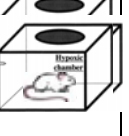
Es presenta a continuació, a tall d'exemple, el pla detallat d'un calendari estàndard de les aclimatacions realitzades i de les extraccions de les mostres:

Horari	Dia -7	Dia -6	Dia -5	Dia -4	Dia -3	Dia -2	Dia -1
9:00 10:00 11:00				en els animals rimentals a la sala perimentació on hi ha la cambra ipobàrica)			

Horari	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
9:00 13:00	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Descans	Descans
							


Horari	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14
9:00 13:00	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Descans	Descans
							

Horari	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia 19	Dia 20	Dia 21
9:00 13:00	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Descans	Descans
							


Horari	Dia 22	Dia 23	Dia 24	Dia 25	Dia 26	Dia 27	Dia 28
9:00 13:00	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Sessió d'aclimatació	Descans	Descans
							

Horari	Dia 29	Dia 30	Dia 31	Dia 32	Dia 33	Dia 34	Dia 35
9: 13: 	Sessió d'acimatació	Sessió d'acimatació FI					
15:00-19:00h	Extracció Mostres	Extracció Mostres					

	Dia 36	Dia 37	Dia 38	Dia 39	Dia 40	Dia 41	Dia 42
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals estabulats.							
Grup Hipòxic + Control	Dia 43	Dia 44	Dia 45	Dia 46	Dia 47	Dia 48	Dia 49
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals estabulats.							

	Dia 50	Dia 51	Dia 52	Dia 53	Dia 54	Dia 55	Dia 56
	Extracció Mostres	Extracció Mostres					

	Dia 57	Dia 58	Dia 59	Dia 60	Dia 61	Dia 62	Dia 63
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals estabulats.							
	Dia 64	Dia 65	Dia 66	Dia 67	Dia 68	Dia 69	Dia 70
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals estabulats.							

	Dia 71	Dia 72	Dia 73	Dia 74	Dia 75	Dia 76	Dia 77
	Extracció Mostres	Extracció Mostres					
0, + Control							

3.1.4 Cambra hipobàrica

S'utilitzà una cambra hipobàrica per sotmetre a les rates al programa d'exposició d'hipòxia hipobàrica intermitent. El volum total de la cambra és d'aproximadament 450 litres (65x90x80 cm), podent introduir en el seu interior 4 caixes de rates. Les parets de la cambra hipobàrica són de plàstic metacrilat, permetent una fàcil visió de l'interior del comportament dels animals durant l'exposició.

El buit relatiu fou provocat per una bomba rotacional de buit (TRIVAC D5E; Leybold, Köln, Alemanya), regulant el flux d'entrada d'aire a l'interior de la cambra mitjançant una vàlvula micromètrica. La pressió interna fou controlada per 2 sensors de pressió diferencials (ID 2.000; Leybold, Köln, Germany) connectats a un controlador de succió (Combivac IT23; Leybold, Köln, Alemanya) conduint un regulador de pressió diafragmàtic (MR16; Leybold, Köln, Alemanya).

Per tal d'arribar a l'altitud simulada es fixà la baixa pressió en el sistema de control. Després d'arribar al nivell desitjat, la pressió baromètrica a l'interior de la cambra fou regulada i mantinguda pel sistema de control, abans descrit, amb una precisió ± 3 mbar.

3.2 Mostres

3.2.1 Mostres per a l'estudi

S'estudiaren els 3 tipus de mostres musculars, que ja hem descrit anteriorment en l'apartat 1.8.1 "*Mostres de l'estudi*" pàg. 43, degut a les diferents característiques funcionals, d'activitat i de composició d'aquests.

3.2.1.1 Miocardi

Per a l'estudi histoquímic s'empraren 2 regions centrals del ventricle dret (Fig. 3.4). En canvi, per als estudis bioquímics s'utilitzà la mateixa regió però del ventricle esquerre.

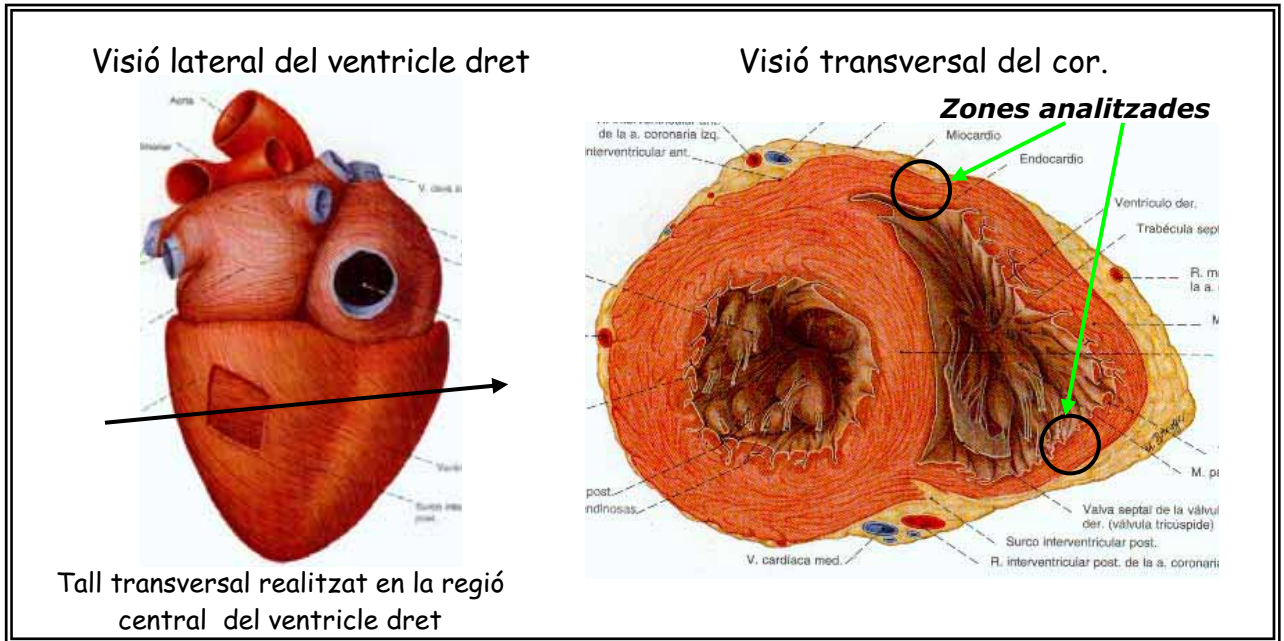


Figura 3.4. Representació gràfica del cor i de les zones estudiades histològicament.

3.2.1.2 Diafragma

Per a l'estudi histològic s'elegeren 3 zones de la *leaflet* regió dreta costal (Fig. 3.5). Per altra banda, per a les anàlisis bioquímiques s'utilitzaren les mateixes regions, però de la zona del diafragma esquerre.

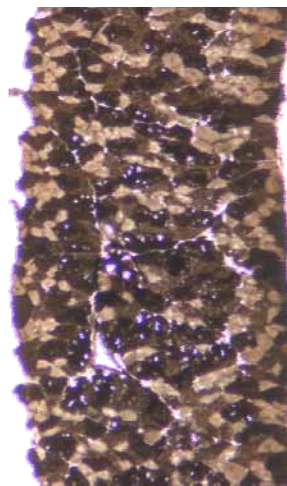
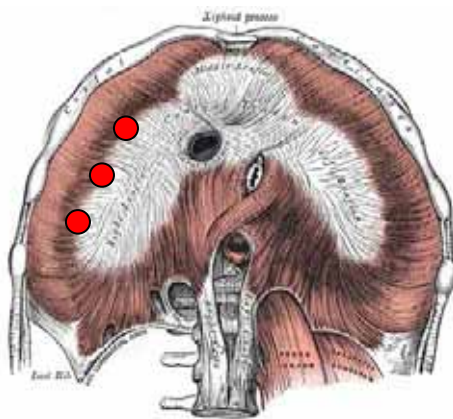


Figura 3.5. A l'esquerra observem un esquema en visió inferior d'un diafragma. Les àrees vermelles indiquen les regions analitzades per als estudis histològics. A la dreta apreciem una tinció a 40 augments de m-ATPasa pH 10,6 (veure apartat 3.3.2.2, pàg. 79) d'un dels diafragmes utilitzats en aquest treball.

3.2.1.3 Tibialis anterior (TA)

S'utilitzà el múscul locomotor esquerre per als estudis histoquímics.

Es marcaren les diferents regions per tal de saber l'orientació anatòmica dels seus talls: en blau la part anterior i en negre l'externa. S'analitzaren 5 regions de la zona equatorial, regió mitjà-medial (Fig. 3.6), ja que per estudis anteriors

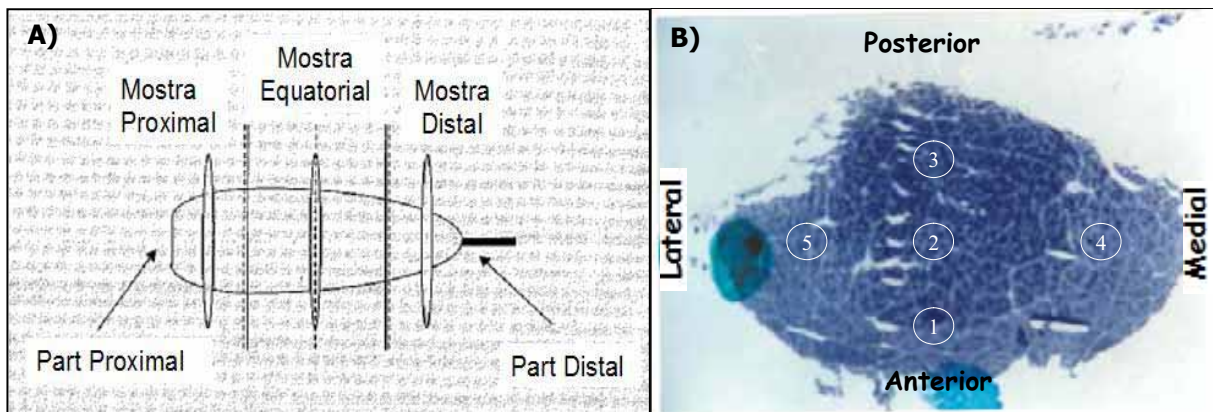


Figura 3.6. A) Esquema amb visió lateral del *tibialis anterior* de rata mostrant les diferents zones que pot estar dividit longitudinalment. Analitzarem la regió equatorial (Torrella et al., 2000) B) Secció transversal de la regió equatorial del tibialis anterior tenyit amb succinat deshidrogenasa, SDH (x9). Els nombres (1-5) indiquen els camps o regions analitzats en aquest estudi histoquímic.

de Torrella i col·laboradors (2000) sabem que cada zona té una composició i característiques diferents (Fig. 3.6). El *tibialis anterior* dret fou destinat per a les proves enzimàtiques i proteiques. En la figura 3.7 podem veure "in-situ" les mostres utilitzades per a l'estudi.

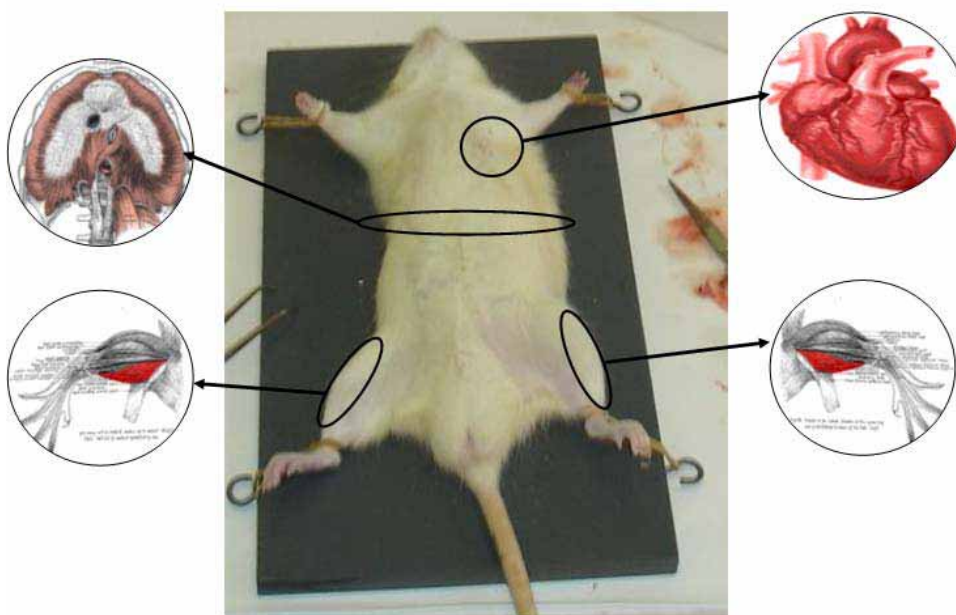


Figura 3.7. Relació dels llocs d'extracció de les diferents mostres utilitzades per a l'estudi.

3.3 Processament de les mostres

3.3.1 Extracció dels músculs i emmagatzematge

Els animals foren anestesiats amb uretà (1,5 g/kg pes corporal, preparat amb 15 g d'uretà/100 ml). La via d'administració elegida fou la intraperitoneal degut a la seva cinètica d'absorció i a la facilitat per a la punció. La dosi: 1 ml/100 g pes. Fins que els animals no estaven ben anestesiats (ho comprovàrem per diferents reflexes) no vàrem extreure les mostres per a l'estudi.

En primer lloc, mitjançant la tècnica de la punció cardíaca extraïrem sang que posteriorment seria analitzada amb el comptador de cèl·lules Celltac α (Nihon Kohden Corporation, Japó) i la introduïrem a l'interior de tubs heparinitzats. Acte seguit, extraïrem el *tibialis anterior* esquerre i acte seguit el dret. Després dels dos *tibialis anterior* procedirem a obtenir el diafragma. A partir d'aquest moment la manipulació havia de ser ràpida i precisa, ja que sense el diafragma l'animal tenia dificultats òbvies per respirar i una mort prematura o un temps de manipulació i/o extracció excessivament llarg podia provocar canvis en els paràmetres enzimàtics/bioquímics. Finalment, amb l'animal sense el diafragma, obríem la caixa toràcica longitudinalment per la línia central, per tal de poder obtenir el cor encara bategant.

En tots els casos es pesaren els músculs en fresc just després de l'extracció, a excepció del diafragma que degut a la dificultat metodològica d'extreure'l tot sencer es decidí no pesar ja que les comparacions podrien no ser del tot correctes. No passà més d'un minut entre l'extracció de les mostres i la seva congelació.

Les mostres destinades per als estudis enzimàtics i proteics (*tibialis anterior* dret, diafragma i ventricle esquerre) foren congelades directament amb nitrogen líquid, i després conservades a l'interior d'uns vials en un congelador de la marca Revcon a -80°C .

Les mostres emprades per als estudis histoquímics (*tibialis anterior* esquerra i diafragma i ventricle dret) foren submergides a l'interior de vials amb 0,5 ml del crioprotector isopentà (3-metil-butà) i després congelades i emmagatzemades en nitrogen líquid a -160°C fins el seu processament.

3.3.2 Processament histoquímic

Un criostat (Frigocut Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanya) a -20°C ens permeté realitzar diferents sèries de talls transversals de $14\ \mu\text{m}$ de gruix, en el mètode dels capil·lars, i de $20\ \mu\text{m}$ en els mètodes SDH i m-ATPases (aquests mètodes seran explicats a continuació). Aquests talls foren de la regió central/mitja de les diferents mostres i es muntaren en portaobjectes, prèviament gelatinitzats al 2%, i incubats durant 5 minuts amb un tampó de fixació de Guth i Samantha (1970): 144 mM cacodilat sòdic, 336 mM sacarosa, 68 mM CaCl_2 i formalina 5%, a temperatura ambient ($T=25^{\circ}\text{C}$) en el cas dels capil·lars i a 4°C en les tincions de SDH i m-ATPases. Aquest procediment de fixació es fa per evitar que els talls es desenganxin dels portes durant les subseqüents operacions.

Acte seguit es realitzaren en paral·lel, però conjuntament els 3 mètodes. Es tallaren les mostres seriadament de manera que a cada tall poguéssim reconèixer els mateixos camps en les diferents tincions. Posant en un mateix porta diferents mostres histològiques però en ell realitzant una sola tinció.

3.3.2.1 Mètode succinat deshidrogenasa, SDH (Nachlas et al., 1957)

Bases metodològiques

Mètode original de Nachlas i col·laboradors (1957) per a detectar l'activitat de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa, SDH.

La tècnica SDH és usada per diferenciar fibres oxidatives de les no oxidatives (o menys oxidatives). En aquest mètode els talls histològics són incubats en un

medi que conté com a substrat de la reacció el succinat de sodi. Una sal de tetrazolium, el Nitro-BT, s'utilitza com a indicador de l'activitat deshidrogenasa de l'enzim. El Nitro-BT és soluble, però al ser reduït com a resultat de la reacció deshidrogenasa es transforma en formazan, un compost insoluble d'un color blau intens que precipita on la reacció deshidrogenasa ha tingut lloc.

El mètode es basa en que les fibres amb major capacitat oxidativa generen més ATP per la via de la fosforilació oxidativa en les mitocòndries. Les cèl·lules musculars que contenen més mitocòndries tindran més capacitat oxidativa. La presència de grans quantitats de l'enzim SDH indicarà fibres de caràcter oxidatiu, mentre que l'absència de deposició de formazan significarà que la fibra muscular posseeix un metabolisme principalment anaeròbic, o menys oxidatiu (Fig. 3.8). En la següent taula s'explica el significat i resultat de les diferents coloracions.

Resultat Tinció	Coloració	Tipus de Fibres
SDH +	Blau intens	Fibres oxidatives
SDH -	Blau clar-blanc	Fibres anaeròbiques

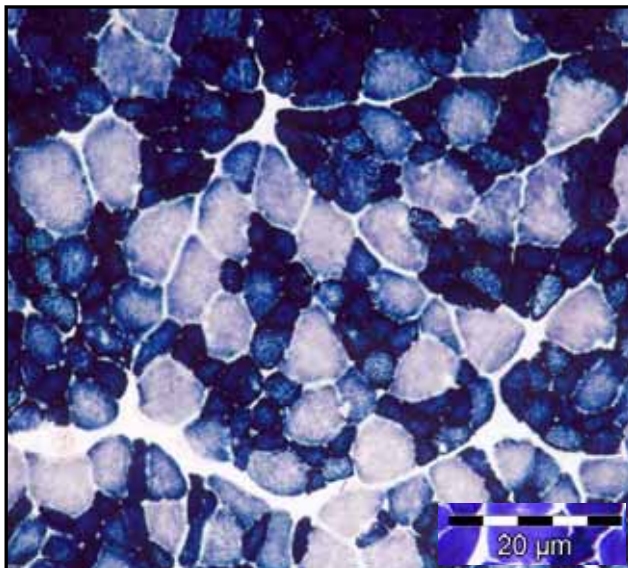


Figura 3.8. Tinció SDH. Fotografia a 100 augments d'una mostra de diafragma realitzada per una càmera digital acoblada a un microscopi òptic.

Protocol

Primer es realitzà una fixació amb formalina-sacarosa (pH=7,6; t=5 minuts). Després de diferents rentats es va procedir a la incubació (veure composició a 3.4 "Preparació/composició medis" pàg. 92) durant 1 hora a una temperatura de 37°C. Acte seguit es procedí al muntatge amb glicerina.

**3.3.2.2 Mètode miosina adenosina-trifosfat, m-ATPasa
(Brooke & Kaiser, 1970)**

Bases metodològiques

Basat en el mètode original de Padykula i Herman (1955a,b) per a detectar l'activitat de Ca^{2+} -ATPasa miofibril·lar, ens permet distingir entre fibres de contracció ràpida o lenta.

El medi d'incubació és una solució tampó amb CaCl_2 i el substrat de la reacció és l'ATP en forma de sal disòdica. La m-ATPasa, localitzada en les miofibrilles de les fibres musculars, hidrolitza la molècula d'ATP alliberant el seu grup fosfat terminal, el qual es combina amb el calci present en el medi d'incubació per a donar una sal insoluble. En les subseqüents reaccions el calci és reemplaçat per cobalt formant una sal, que a la seva vegada, és reemplaçada per sulfur d'amoni. El precipitat marró fosc format posa de manifest els punts on ha tingut lloc la hidròlisi d'ATP.

La preincubació a diferents valors de pH (àcids i alcalins), inhibeix selectivament l'activitat m-ATPasa. La pre-incubació àcida inhibeix l'activitat m-ATPasa en les fibres ràpides, però no en les lentes. Contràriament, una pre-incubació alcalina inhibeix l'activitat ATPasa solament en les fibres lentes. D'aquesta manera podem classificar les fibres musculars depenent dels criteris i nomenclatura de la següent taula i de la Figura 3.9:

Tipus de Fibra	pH=4,2	pH=4,6	pH=10,7	Contracció
SO	+	+	-	lenta
FOG	-	-	+	ràpida
FG	-	+/-	+	ràpida

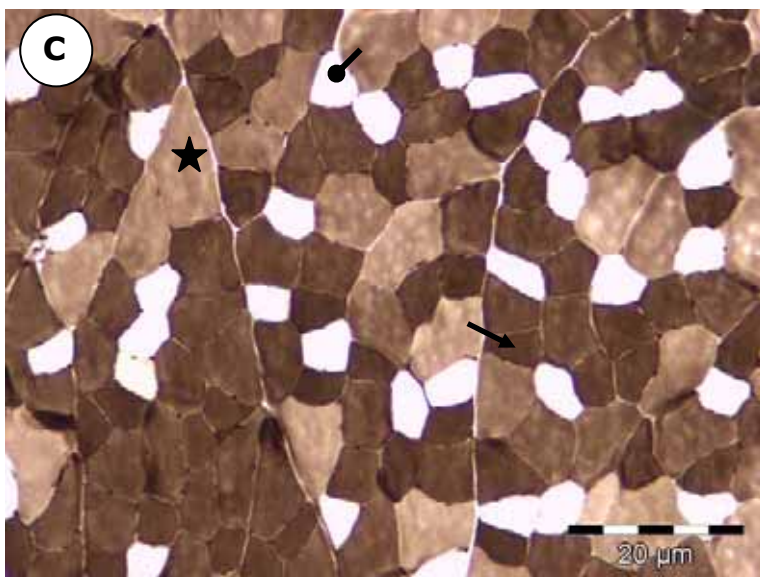
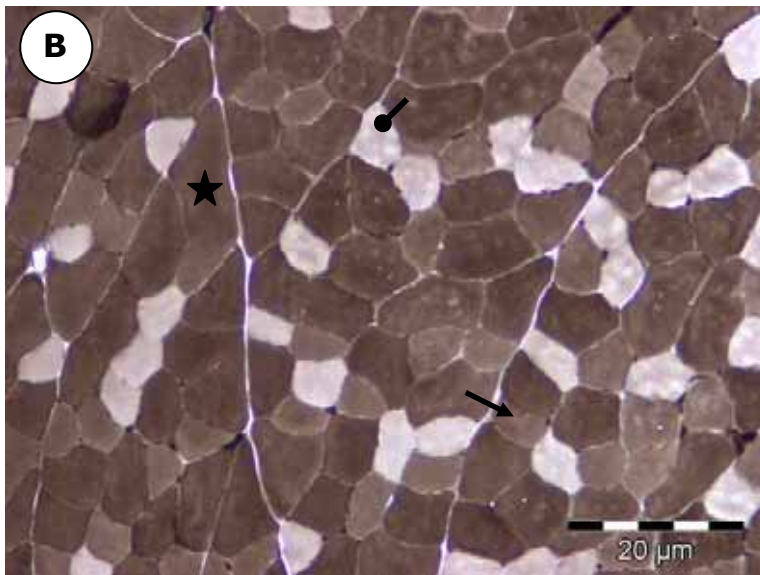
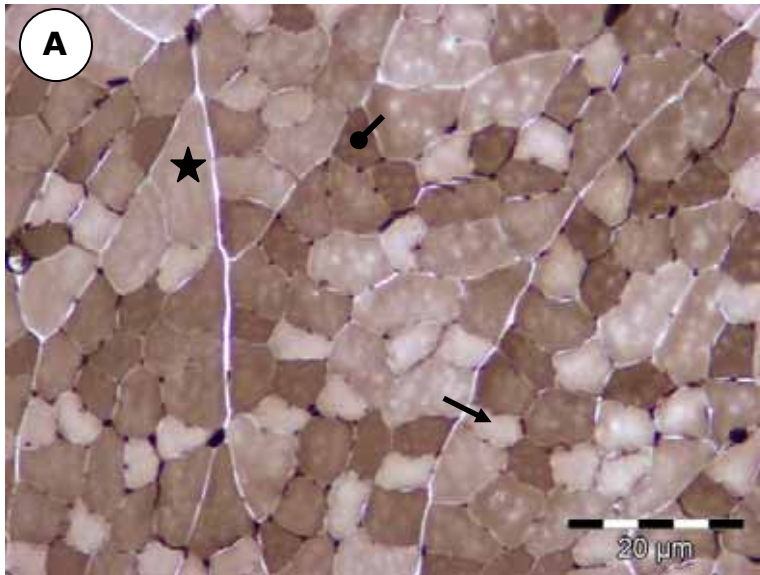


Figura 3.9. Fotografies de talls seriats a 100 augments, realitzades per una càmera digital acoblada a un microscopi òptic, de *tibialis anterior* amb la mateixa tinció de m-ATPasa, però amb 3 pHs diferents en el medi de pre-incubació:

- A) pH 4,2
- B) pH 4,6
- C) pH 10,6

Podem observar el canvi de coloració en la mateixa fibra muscular depenent de l'acidesa del medi de pre-incubació. A mode d'exemple:

- SO
- ★ FG
- ↘ FOG

Protocol

En primer lloc es realitzà una fixació amb formalina-sacarosa durant 5 minuts a 4°C. Després es preincubaren paral·lelament els talls seriat: 2 en un medi àcid (pH=4,2 i 4,6) compost per 100 mM KCl i 100 mM Acetat de sodi durant 5 minuts i l'altre en un medi alcalí (pH=10,6) compost per 50 mM glicina, 30 mM CaCl₂ i 50 mM NaCl durant 10 min (veure composició en 3.4.2 "*Preparació/composició medis*" pàg. 92). En tots els casos la temperatura de preincubació va ser de 25°C. A partir d'aquest punt totes les mostres reberen el mateix tractament. La incubació es dugué a terme durant 30 minuts a una temperatura de 37°C en un medi amb pH=9,4 la composició del qual fou: 3 mM ATP, tampó glicina/NaOH i 30 mM CaCl₂. Acte seguit es tenyiren amb CaCl₂ al 1% i CoCl₂ al 2% durant 3 minuts en cada cas i finalment amb sulfur d'amoni 1% durant 50 segons. Després de varis rentats es procedí al seu muntatge amb glicerina.

3.3.2.3 Mètode per a la coloració dels capil·lars, e-ATPasa (Fouces et al., 1993)

Bases metodològiques

Basat en el mètode original de Rosenblatt i col·laboradors (1987) per a tenyir els capil·lars de la musculatura en talls transversals, permet la visualització de l'activitat de l'ATPasa de les cèl·lules de l'endoteli capil·lar (Fig. 3.10). Aquest fet és possible gràcies a la presència d'ions de Pb²⁺ en el medi d'incubació, els quals precipiten com a conseqüència del tractament amb sulfur d'amoni en la part final del protocol.

Protocol

A l'inici es fixà amb el medi formalina-sacarosa durant 5 minuts a 25°C. Després de successius rentats es procedí a la incubació (veure composició en 3.4.3 "*Preparació/composició medis*" pàg. 94) durant 1 hora a una temperatura de 37°C. Es tornaren a realitzar varis rentats i es tenyí les mostres amb sulfur d'amoni al

2% durant 1 minut. Acte seguit es rentaren amb aigua de l'aixeta durant 10 minuts i es muntaren amb glicerina.

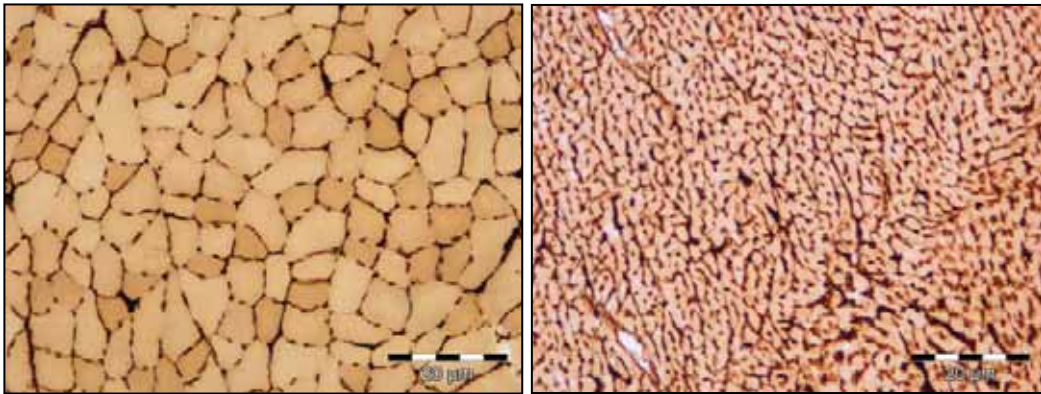


Figura 3.10. Fotografies de la tinció de capil·lars pel mètode e-ATPasa de Fouces et al., 1993. A l'esquerra s'exhibeix una mostra de *tibialis anterior*. A la dreta, una mostra de miocardi. Totes dues fotos són fetes als mateixos augments (x100).

3.3.2.4 Mesures i paràmetres morfomètrics

Es fotografiaren diferents regions o camps de cada mostra a diferents augments (100x i 400x en el cas del miocardi, i a 40x i 100x en els casos de diafragma i *tibialis anterior*) amb un microscopi òptic (Olympus BX 40, Japan) equipat amb una càmera digital acoblada (Olympus, CC-12). Les imatges foren captades amb format electrònic mitjançant el programa informàtic AnalySIS® (soft imaging system, Alemanya). El processament, tractament i anàlisi de les imatges es feren amb el software (Fig. 3.11) Sigma-Scan Pro 5 de Jandel Scientific (Erkrath, Alemanya).

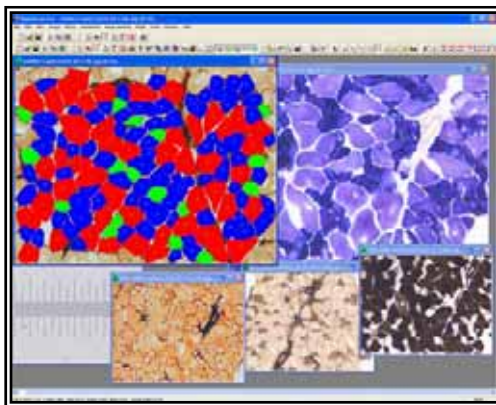


Figura 3.11.

Exemple real del processament de les mostres mitjançant el software d'anàlisi d'imatges Sigma Scan Pro 5.

De cada animal i múscul s'estudiaren les següents superfícies i nombre de fibres:

Mostra	Superfície/camp (μm^2)	Nombre camps	Superfície total/mostra (μm^2)	Fibres estudiades per animal	Fibres totals
Miocardí	35.265	2	70.530	173	6.389
Diafragma	575.781	3	1.727.343	373	13.406
<i>Tibialis anterior</i>	575.781	5	2.878.905	620	22.320
					42.115

Per tal d'assegurar un calibratge més acurat de totes les mesures obtingudes es capturen imatges d'una escala micromètrica cada cop que es fotografiaven les mostres.

S'analitzaren els següents paràmetres en els 3 músculs:

- **Densitat capil·lar (CD)**: nombre de capil·lars per mm^2 .
- **Densitat de fibres musculars (FD)**: nombre de fibres per mm^2 .
- **FCSA**: àrea de la secció transversal de cada fibra expressada en μm^2 .
- **Perímetre (FPER)** de cada fibra expressat en μm .
- **NCF**: nombre de capil·lars en contacte amb cada fibra (Fig. 3.12) .

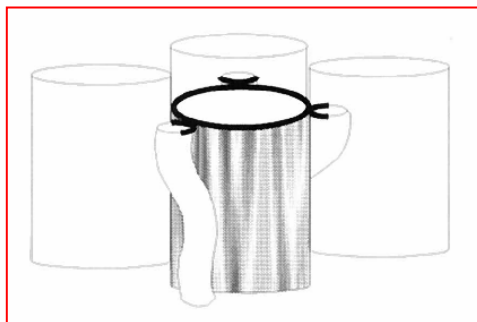


Figura 3.12. Representació esquemàtica del paràmetre **NCF** (nombre de capil·lars en contacte amb cada fibra). En aquest cas serien 3 capil·lars.

- **Màxima distància de difusió (MDD)**: distància mitja des de la membrana fibril·lar (sarcolema) al centre de la fibra expressada en μm (Fig.

3.13). L'equació del paràmetre MDD és = $\frac{\sqrt{4 \cdot \text{àrea}}}{\text{perímetre}}$

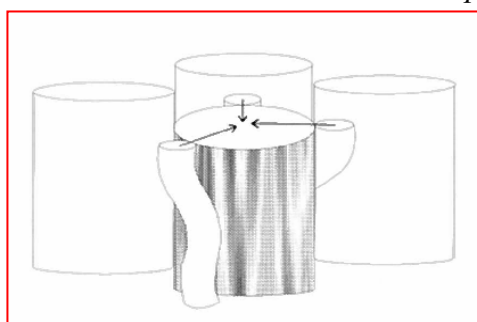


Figura 3.13. Representació esquemàtica del paràmetre **Màxima distància de difusió (MDD)**.

- **Shape Factor.** índex de 0 a 1 que indica la morfologia de les fibres. (Quan l'índex sigui més pròxim a 1, la fibra més s'aproximarà a una esfera perfecta). Matemàticament, $Shape\ factor = \left(\frac{4 \cdot \Pi \cdot \text{àrea}}{\text{perímetre}^2} \right)$

També s'estudiaren les següents relacions:

- **CCP:** nombre de capil·lars en contacte amb 100 μm de perímetre de fibra.

$$\text{CCP} = \frac{NCF \cdot 10^2}{\text{Perímetre}}$$

- **CCA:** nombre de capil·lars en contacte amb 1000 μm^2 d'àrea de fibra.

$$\text{CCA} = \frac{NCF \cdot 10^3}{\text{Àrea}}$$

- **C/F:** *capillarity-to-fiber ratio*. Densitat Capil·lar/Densitat de Fibres. (CD/CF).

En el diafragma i en el TA, degut al diferents tipus de fibres musculars que el formen, també s'estudiaren:

- **Proporcions de cada tipus fibril·lar:** percentatge de cada tipus de fibra. Cada un dels paràmetres (**FCSA**, **FPER**, **NCF**, **MDD**, **Shape Factor**, **CCP** i **CCA**) van ser expressats respecte cada tipus de fibra.

Tots els recomptes, càlculs i mesures foren realitzades per la mateixa persona per evitar o disminuir els errors d'apreciació.

3.3.3 Processament bioquímic.

3.3.3.1 Homogeneïtzació de les mostres

Les mostres a homogeneïtzar en tots els casos estaven netes de teixit conjuntiu i greix. S'agafà sempre la mateixa regió del teixit per evitar possibles diferències regionals. Es feu servir el mateix protocol i medi d'homogeneïtzació per a les anàlisis enzimàtiques (LDH i CS) i per a la determinació de proteïnes totals.

S'agafaren uns 20 mg de teixit humit i s'afegí medi per homogeneïtzar en una relació de 10 mg:1 ml. El medi estava compost per: 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂ i 75 mM Tris-HCl, pH=7,6 a 25°C (Reed et al., 1994).

S'homogeneïtzaren mecànicament sobre gel les mostres amb un politró Potter-Elvehjem, emprant 3 cicles de 20 segons, amb un descans de 10 segons entre cada cicle. Entre mostres diferents s'efectuaren rentats amb aigua de l'aixeta (2 cicles de 15 segons) i posteriorment amb aigua destil·lada (3 cicles de 15 segons). És important emprar sempre el mateix temps per homogeneïtzar per evitar diferències entre les mostres per escalfament. Temps molt llargs d'homogeneïtzació de la mostra (més de 4-5 minuts) poden provocar una disminució de la concentració dels pigments, degut a la desnaturalització de les cromoproteïnes per la calor.

Es passaren els homogeneïtzats a tubs Eppendorf i s'emmagatzemaren a -80°C fins al seu estudi. En el cas de la mioglobina, el pes del teixit muscular fou d'aproximadament 50 mg i s'administrà tampó fosfat 0,04 M a pH=6,6 (19,25 ml de tampó per cada 1000 mg de teixit; Reynafarje, 1963).

Els cicles d'homogeneïtzació i de rentat foren els mateixos que els descrits anteriorment per a les altres proves. En aquest cas les mostres no es congelaven si no que s'analitzaven acte seguit.

3.3.3.2 Anàlisi de l'activitat enzimàtica de la lactat deshidrogenasa (LDH), EC 1.1.1.27 (Beutler, 1977)

Protocol

Es centrifugà a 10.000 g a 4°C durant 5 minuts amb una centrífuga (Mikro 200 Hettich zentrifugen, Alemanya) les mostres homogeneïtzades prèviament. Es feren duplicats i es diluïren depenent de les seves activitats per tal d'ajustar-se a una recta i al temps de reacció. Les dilucions foren les següents:

Miocardí: 400 µl sobrenedant + 600 µl tampó per homogeneïtzar.

Diafragma: 500 µl sobrenedant + 500 µl tampó per homogeneïtzar.

Tibialis anterior: 200 µl sobrenedant + 800 µl tampó d'homogeneïtzació.

S'agafaren 20 µl del sobrenedant diluït anterior i hi afegirem el medi d'assaig en un tub Eppendorf i agitarem enèrgicament en un vòrtex.

El medi d'assaig constà de:

Reactius	Concentració Inicial	Vol (µl)	Concentració Final
Tris HCl-EDTA, pH 8,0	1M, 5 mM	100	0,1 M, 0,5 mM
NADH	2 mM	100	0,2 mM
H₂O destil·lada		680	
Sobrenedants diluïts		20	

S'incubà 10 minuts a 37°C en un bany termostatat (Certomat® WR, B. Braun) i just abans de llegir s'afegí 100 µl de piruvat de sodi amb concentració inicial de 10 mM.

Es realitzaren les lectures en cubetes d'espectrofotòmetre d'1 cm de pas de llum i es llegí a 340 nm en l'espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, EUA) a una temperatura d'assaig de 37°C en bany termostatat.

L'activitat fou mesurada per l'índex de desaparició del NADH.

ΔA_{340} , coeficient d'extinció milimolar $\rightarrow \epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Les lectures s'efectuaren a intervals de 15 segons durant 180 segons.

Càlculs

Els càlculs es fan a partir de la regió lineal de la cinètica enzimàtica basant-nos en l'equació de Lambert-Beer que ve definida:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

A= absorbància; $\varepsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; **l** = longitud cubeta = 1 cm ; **C** = concentració en mM

Si aïllem la C tenim: $\frac{1}{C} = \frac{\varepsilon \cdot l}{A}$, i per tant: $C = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$

Considerem la variació d'absorbància (ΔA) respecte al temps com a l'activitat enzimàtica, tenint en compte la diferència d'absorbància inicial (A_1)-final (A_2) i la diferència de temps, en segons, de la regió lineal de la cinètica:

Activitat enzimàtica = $\Delta C = \Delta A / \Delta t \cdot \varepsilon \cdot l$, on tenim que: $\Delta A = |A_1 - A_2|$

$$\Delta t = t_2 - t_1$$

Si es té en compte aquesta activitat respecte al pes de les mostres musculars, s'obté l'**activitat enzimàtica específica**: $\mu\text{mols/ minut}$ gram pes humit múscul.

IU (Unitats Internacionals)

3.3.3.3 Anàlisi de l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa (CS), EC 4.1.3.7 (Srere, 1969)

Protocol

Es centrifugà a 10.000 g durant 6 minuts a 4°C amb una centrífuga (Mikro 200 Hettich zentrifugen, Alemanya) les mostres prèviament homogeneïtzades. Es recuperaren els sobrenadants i es mantingueren en gel. Posteriorment, es diluïren aquests sobrenadants depenent de les seves activitats per tal d'ajustar-se a una recta. Les dilucions foren:

Miocardí: 125 µl sobrenedant + 875 µl tampó per homogeneïtzar.

Diafragma: 200 µl sobrenedant + 800 µl tampó per homogeneïtzar.

Tibialis anterior: 200 µl sobrenedant + 800 µl tampó d'homogeneïtzació.

Reactius		Volum (µl)	Concentració Final (mM)
Tris HCl 0,15 M pH=8,0	Miocardí	550	82,5
	Diafragma	425	63,75
	<i>Tibialis anterior</i>	425	63,75
MgCl 15mM		100	1,5
Acetil CoA 2mM		100	0,2
DTNB		100	0,1
Mostra	Miocardí	50	---
	Diafragma	175	---
	<i>Tibialis anterior</i>	175	---

Primer s'addicionaren tots els constituents, excepte l'oxalacetat (OAA), per monitoritzar l'activitat deacilasa no específica, i es deixaren incubar 7 minuts a temperatura ambient. Acte seguit s'afegiren 100 µl d'OAA 5 mM.

L'activitat CS es determinà com un augment d'absorbància (ΔA) a $\lambda = 412$ nm a 37°C després d'afegir l'OAA. A aquesta longitud d'ona hi ha una forta absorció de l'ió mercaptídic.

(ΔA_{412} , coeficient d'extinció milimolar $\rightarrow \epsilon_{412} = 13.600 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Les lectures es feren a intervals de 15 segons durant 180 segons en un espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Miton Roy company, EUA).

Càlculs

Es seguí la mateixa base teòrica i metodològica que per als càlculs de l'activitat LDH (pàg. 87), però amb la diferència del valor del coeficient d'extinció milimolar, en aquest cas $\epsilon_{412} = 13,600 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3.4 Índex d'activitat LDH/CS

Adicionalment fou calculat el *ratio* de les dos activitats enzimàtiques, ja que és usat generalment com un indicador dels ajustaments relatius entre els potencials metabòlics anaeròbic i aeròbic (Hochachka et al., 1983).

3.3.3.5 Determinació de la concentració de mioglobina, Mb (Reynafarje, 1963)

Protocol

L'homogenat (obtingut com hem explicat anteriorment a l'apartat 3.3.3.1 "*Homogeneïtzació de les mostres*" pàg. 85) fou centrifugat refrigeradament a 4°C a 28.000 g durant 50 minuts en la ultracentrifuga Sorvall®Ultra Pro 80 ultracentrifugue, Dupont (EUA). Es recuperà el sobrenedant i s'administrà CO pur (Air Liquide®) sota una campana d'extracció de gasos durant 6 minuts amb un dispensador de vidre multicanal a tubs de 10 ml tapats amb Parafilm®.

S'administrà una quantitat aproximada de 30 mg de ditionit sòdic, corresponent a una petita espàtula, per tal d'assegurar la completa reducció dels pigments. Tornàrem a gasejar amb CO durant 4 minuts més. Vàrem tapar el tubs fins a la lectura.

Es transferí la solució a cubetes Beckman d'1 cm de pas de llum i es va llegir la densitat òptica puntual (DO) a 538 i 568 nm en l'espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, EUA).

Càlculs

La diferència entre les dos DO ($A_{538} - A_{568}$) és multiplica pel factor 117,3 i el resultat expressà la concentració de mioglobina en mg/g teixit fresc (Reynafarje, 1963).

3.3.3.6 Quantificació de proteïnes totals (Bradford, 1976)

Protocol

Inicialment les mostres tenien una concentració de 10 mg/ml i ens interessava una concentració final d'aquestes de 2,5 mg/ml, per la qual cosa es van diluir 250 μ l de mostra homogeneïtzada amb 750 μ l de tampó PBS.

Tant en les mostres com en la recta patró es realitzaren duplicats i de cada duplicat s'efectuaren 2 lectures (Fig. 3.14).

En un tub de 5 ml es mesclaren 50 μ l de la mostra (prèviament diluïda en PBS) i 2,5 ml de Blau Brillant de Coomassie [ABC G-250, Fluka Chemica, 0,01% (p/v), etanol 4,7 % (v/v), àcid fosfòric (H_3PO_4) 8,5 % (p/v)].

S'agità i s'incubà 15 minuts a temperatura ambient.

Després del temps d'incubació es llegiren les mostres a l'espectrofotòmetre de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Finlàndia) amb el software corresponent (Genesis Labsystems versió: 2.16) a $\lambda=620$ nm.

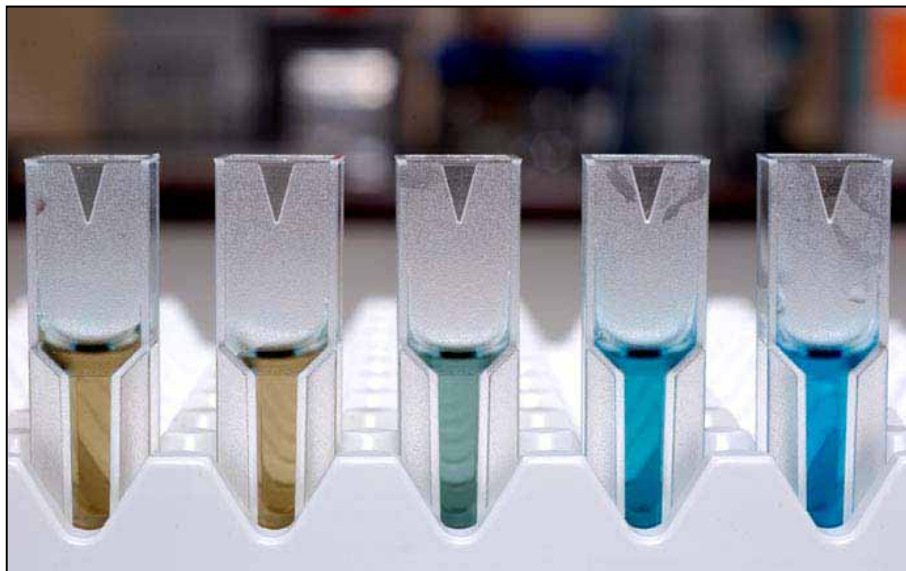


Figura 3.14. Banc de dilucions de mostres amb diferents concentracions de proteïnes analitzades pel mètode de Bradford, 1976.

3.3.4 Processament hematològic

Un cop es tingué la sang en tubs heparinitzats es deixaren rodar durant uns 10 minuts en un agitador rotatori de tubs per tal d'homogeneïtzar la mostra sense provocar hemòlisi. Després s'analitzaven els paràmetres hematològics amb el comptador de cèl·lules Celltac α (Nihon Kohden, Corporation Japó).

Els paràmetres hematològics estudiats foren:

WBC (White blood cell): cèl·lules sanguínies de la línia blanca ($10^3/\mu\text{l}$).

RBC (Red blood cell): cèl·lules sanguínies de la línia vermella ($10^6/\mu\text{l}$).

Hb (Hemoglobina): concentració d'hemoglobina (g/dl).

Hct (Hematòcrit): volum dels eritròcits amb relació a la sang total (%).

MCV (Mean corpuscular volume): volum corpuscular mig és el volum mig dels eritròcits en fL. Ve donat per l'expressió:

$$VCM = \frac{HTC \cdot 10}{Rc}, \text{ on } Rc \text{ són milions d'eritròcits per } \text{mm}^3 \text{ de sang.}$$

MCH (Mean corpuscular hemoglobin): l'hemoglobina corpuscular mitjana és la quantitat mitjana d'hemoglobina per eritròcit, expressada amb picograms (10^{-12}g). Es calcula segons l'expressió: $MCH = \frac{Hb \cdot 10}{Rc}$, on Rc són milions d'eritròcits per mm^3 de sang.

MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration): concentració mitjana d'hemoglobina dels eritròcits, és a dir la quantitat (en g) que hi ha en 1 dL de

glòbuls vermells:
$$MCHC = \frac{Hb}{\left(\frac{Hct}{100}\right)} = Hb \left(\frac{100}{Hct} \right)$$

3.4 Preparació/composició medis

3.4.1 Mètode succinat deshidrogenasa, SDH (Nachlas et al., 1957)

Medi de fixació (Enrasem a 1 litre amb formalina 5%):

- Cacodilat sòdic	0,144 M	30,8 g
- Sacarosa	0,336 M	115 g
- CaCl ₂	0,068 M	7,5 g

Medi d'incubació (per a 50 ml):

- Tampó fosfat, PBS (0,2 M) pH=7,6
- Solució succinat sòdic (0,2 M)
- Nitroblue tetrazolium (Nitro BT) 1 g/l

Es mesclen a parts iguals PBS + solució succinat. La solució resultant es mescla també a parts iguals amb la solució de nitro BT. Les quantitats exactes per a 50 ml són les següents:

12,5 ml PBS + 12,5 ml solució de succinat (0,6754 g).

Es mescla aquesta solució (25 ml) amb una solució de 25 ml de Nitro BT (25 mg).

- Tampó fosfat (PBS):

- + 250 ml fosfat d'àcid potàssic (KH₂PO₄) 0,2 M (6,8 g)
- + 212,5 ml NaOH (0,2 N) 1,75 g (riquesa 97%)
- + Aigua destil·lada fins a 1 litre

3.4.2 Mètode miosina adenosin-trifosfat, m-ATPasa (Brooke & Kaiser, 1970)

Medi de fixació (Enrasem a 1 litre amb formalina 5%):

- Cacodilat sòdic	0,144 M	30,8 g
- Sacarosa	0,336 M	115 g
- CaCl ₂	0,068 M	7,5 g

Medi de preincubació:

2 Medis àcids: pH=4,2 i pH=4,5 Composició del medi per a 200 ml:

- 100 ml 100 mM KCl
- 100 ml 100 mM Acetat de sodi

Ajustar pH adient amb àcid acètic glacial 100%

Medi alcalí: pH=10,7 (Ajustar pH amb NaOH 2N). Composició del medi per a 180 ml:

- 60 ml 50 mM glicina
- 60 ml 30 mM CaCl₂
- 60 ml 50 mM NaCl

Medi d'incubació: pH=9,4 (Ajustar pH amb HCl). Composició del medi per a 150 ml:

- 75 ml 30 mM CaCl₂
- 75 ml tampó glicina / NaOH
- 3 mM ATP (0,24804 g)

Solucions:

- 30 mM CaCl₂ 3,51 g CaCl₂/litre
- 50 mM glicina 3,75 g glicina/litre
- 50 mM NaCl 2,92 g NaCl/litre
- 100 mM KCl 7,46 g KCl/litre
- 100 mM acetat de sodi 8,20 g acetat de sodi/litre
- Tampó glicina / NaOH: es mesclen 300 ml solució A + 700 ml solució B

Solució A (500 ml):

- 3,75 g de glicina
- 2,93 g de NaCl

Solució B:

- 4,12 g NaOH en 1 litre (N=0,1)

3.4.3 Mètode per a la tinció dels capil·lars, e-ATPasa (Fouces et al., 1993)

Medi de fixació (Enrasem a 1 litre amb formalina 5%):

- Cacodilat sòdic	0,144 M	30,8 g.
- Sacarosa	0,336 M	115 g.
- CaCl ₂	0,068 M	7,5 g.

Medi d'incubació:

- 1,2 g gelatina en 80 ml d'aigua destil·lada.
- 1,9 g tris-maleat (afegits a la solució anterior donen una molaritat de 0,1 M)
- 12 ml solució 0,06 M nitrat de plom (0,24 g)
- 20 ml solució 0,068 M CaCl₂ (7,55 g CaCl₂ en 1 litre)
- 80 ml aigua destil·lada.
- 100 mg de ATP (sal disòdica).

El pH resultant és de 3,55 i s'ha d'ajustar a pH=7,2 amb NaOH.

Solucions

Sulfur d'amoni 2%, 1 litre: 200 ml sulfur d'amoni 10% + 800 ml aigua destil·lada.

3.4.4 Quantificació de proteïnes totals (Bradford, 1976)

Preparació dels Reactius:

- **Blau Brillant de Coomassie** (ABC, Fluka 27815). Per a preparar el reactiu s'ha de mantenir el següent ordre:
 Agafar 0,05 ml d'ABC G-250 (Fluka Chemika, C-1). Concentració final ABC: 0,01% (p/v).
 Dissoldre en 25 ml d'etanol 95% (v/v) en aigua destil·lada (23,75 ml d'etanol + 1,25 ml d'aigua destil·lada. Concentració final d'etanol: 4,7%).
 Agregar 50 ml d'àcid fosfòric (H_3PO_4) al 85% (p/v). Concentració final H_3PO_4 : 8,5% (p/v)
 El filtrat resulta un líquid marró transparent. Emmagatzemar a 4°C.
- **γ -Globulina:** 2 mg/ml
 Pesar 0,020 g de gamma globulina i diluir en 10 ml de PBS.
 Concentració final: 2,0 mg/ml.
 Utilitzar sempre fresc, al·liqüotar (1,8 ml-2 ml) i guardar congelat.
- **PBS** 10 mM + 0,15 M NaCl, pH=7,4
 1,78 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
 1,56 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
 8,766 g NaCl
 Enrasar fins a 1 litre.

Es prepara la recta patró amb γ -globulina i PBS.

La recta patró ve definida entre 0 i 100 μ g de γ -globulina:

μ g. γ -globulina	0	20	40	60	80	100
Stock γ-globulina (2mg/ml)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tampó	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0

3.5 Taules amb els reactius emprats

3.5.1 Histoquímica

Reactiu	Casa Comercial	Codi
Acetat de sodi anhidre	Panreac	131633
ATP	Sigma	A-3377
CaCl ₂	Panreac	181221
Cacodilat Sòdic	Panreac	375301
Carbonat de calci	Panreac	131212
Cobalt II Clorur6hidrat	Panreac	202185
Etanol 96% v/v	Panreac	121085.16.11
Folin-Ciocalteau	Panreac	251567.1609
Formaldehid 38 %	Panreac	141328.1211
Gelatina Or	Panreac	251336.1209
Glicerina	Panreac	141339
Glicina	Sigma	g-7126
Isopentà	Sigma	D-14,575-O
KCl	Panreac	141494.1210
Medi d'inclusió	Jung	100 ml.
Metanol	Panreac	13.10.91.1612
NaCl	Sigma	s-5886
NaOH	Panreac	131687
Navalles criostat	Leica	Model 818. Ref: 8071054
Nitrat de Plom	Panreac	131473
NitroBlue Tetrazolium	Sigma	n-6876
Sacarosa	Panreac	131621
Succinat Sòdic	Panreac	132052
Sulfur d'amonio 10%	Panreac	141145.1611
Tris-Maleat	Sigma	t-3128
Uretà	Fluka	943001000
Heparina	Rubilabor/Eurotube	705000

3.5.2 Concentració de Mioglobina

Reactiu	Casa Comercial	Referència	Codi
Bombona CO	Air Liquid		
Ditionit Sòdic (S ₂ Na ₂ O ₄)	Fluka	71699	
Fosfat potàssic (KH ₂ PO ₄)	Sigma	P-5379	110
Fosfat sòdic (Na ₂ HPO ₄)	Sigma	71632	37 / 107
Tris HCl	Flucka	93374	

3.5.3 Assajos Enzimàtics

Reactiu	Casa Comercial	Codi
Acetil-CoA	Sigma	A2181
Acetoacetil-CoA	Sigma	A1625
DTNB	Sigma	D8130
EDTA	Sigma	25,404-5
Imidazole	Sigma	I0125
MgCl ₂	Panreac	141396.1209
MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma	M-3634
Na ⁺ Pyr.	Panreac	372383.1206
NADH	Sigma	N6005
OAA	Sigma	O-4126
Tris-Base	Sigma	T-1503

3.5.4 Determinació Concentració Proteïnes Totals

Reactiu	Casa Comercial	Codi
γ-globulina	Sigma	G-7516
Blau Brillant de Coomassie	Fluka Chemika	27815
H ₃ PO ₄	Panreac	131032
NaH ₂ PO ₄	Panreac	1316781210

Mostra	Superfície/ camp (μm ²)	Nombre camps	Superfície total/mostra (μm ²)	Fibres estudiades per animal	Fibres totals
Miocardí	35.265	2	70.530	173	6.389
Diafragma	575.781	3	1.727.343	373	13.406
<i>Tibialis anterior</i>	575.781	5	2.878.905	620	22.320
					42.115