

PACIENTS I MÈTODE

PACIENTS:

Pel desenvolupament dels estudis inclosos en aquesta tesi, s'ha establert quatre grups de pacients:

- **Grup A:** voluntaris sans fumadors habituals (des de fa més de 5 anys) de 20 cigarretes al dia o més que han acudit per a deshabitació, sense cap altre costum tòxic ni consum de fàrmacs al moment de l'estudi ni de forma crònica. S'han exclòs les persones que durant l'estudi han hagut de rebre algun tipus de tractament, han presentat una malaltia concomitant o han consumit algun tòxic. S'ha realitzat una anamnesi de la dieta durant la setmana prèvia a l'estudi i s'han exclòs les persones amb un consum de substàncies amb marcades propietats antioxidants. S'han extret 30ml de sang perifèrica en els següents moments: basal (el dia que inicien la deshabitació), als 7 dies i a les 4 setmanes d'haver abandonat el tabac.
- **Grup B:** voluntaris sans no fumadors, però amb consum previ ocasional (menor de 1 paquet a l'any), amb les mateixes condicions que els del grup A. També s'ha realitzat una anamnesi de la dieta i s'han eliminat aquells pacients amb un consum elevat de substàncies marcadament antioxidants. S'han extret 30ml de sang perifèrica en els següents moments: basal (dia 0), després d'haver fumat 5 cigarretes (nicotina 0.8mg, quitrà 11mg) en 45 minuts (dia 0), a les 24h, als 7 dies i a les 4 setmanes del consum "agut".
- **Grup C:** voluntaris prèviament sans que han acudit al servei d'urgències a causa d'una intoxicació aguda per monòxid de carboni. S'han exclòs las persones fumadores i les que estaven rebent algun tipus de tractament. S'han extret 30ml de sang perifèrica en els següents moments: basal (en el moment del diagnòstic d'intoxicació per monòxid de

carboni), als 3 dies després d'aplicació del tractament adequat (sia oxigenoteràpia hiperbàrica o normobàrica, segons el cas) i als 14 dies després del tractament.

- Grup D: S'han obtingut mostres de teixit muscular del múscul quàdriceps (*vastus lateralis*) de pacients sotmesos a cirurgia ortopèdica (pròtesi de maluc) sota anestèsia loco-regional (ref.104,105). S'han exclòs aquells pacients amb diagnòstic previ de malaltia neuromuscular clínica o subclínica i/o historia familiar de malaltia neuromuscular. Tots els individus seleccionats han tingut edat similar, activitat física similar, i tots han estat considerats no fumadors, evitant així possibles factors de confusió en els estudis de funcionalisme mitocondrial (ref.106,107,70,108,109). S'ha considerat no fumadora aquella persona que mai ha consumit tabac o aquella que ha romàs abstinent durant més d'un any. Només s'han inclòs a l'estudi els pacients que eren capaços de caminar cada dia al carrer, seguint la classificació de Steinbrocker (ref.110). Malgrat l'obtenció d'una mostra de múscul no representa cap perill addicional durant la intervenció quirúrgica, s'ha informat adequadament a cada malalt, el qual ha donat el seu consentiment.

MÈTODE:

- Determinació de l'estat de fumador o no fumador:

La sinceritat en quant al consum de tabac referit per cada individu i la comprovació del consum de tabac requerit en cada temps dels estudis s'ha fet mitjançant la determinació monòxid de carboni en aire exhalat (COAE) mitjançant un transductor electroquímic (Dräger Pac III, Dräger Safety Inc, Pittsburgh, PA, USA), i nivells de carboxihemoglobina (COHb) en sang perifèrica, mitjançant CO-oximetria (Blood gas Analyzer CIBA-

CORNING 800 System, Basel, Switzerland). Ambdós són marcadors de consum de tabac àmpliament acceptats a la literatura mèdica (ref.99,111). En els grups A i B, hem considerat abstinent, en quant al consum de tabac, aquells amb nivells de COAE inferiors a 10ppm i COHb inferior a 2%. Òbviament, al grup C aquestes determinacions han servit pel propi diagnòstic i com a control de consum de tabac en les determinacions successives.

- Extracció de limfòcits circulants en sang perifèrica:

De les mostres de sang dels individus del grups A, B i C, s'han aïllat limfòcits mitjançant centrifugacions successives en un gradient de Ficoll, i s'ha determinat la concentració de proteïna limfocitària mitjançant el mètode de Bradford (ref.112).

- Aïllament de mitocondris:

En el grup D, les mostres de teixit muscular s'han obtingut a l'inici del procediment ortopèdic i immediatament han estat immerses en un medi amb 20mM Tris (pH 7.2), 250mM sucrosa, 40mM KCl, 2mM EGTA i 1mg/ml d'albúmina sèrica bovina (BSA) a 4°. La mostra s'ha processat en menys de 5 minuts.

Els mitocondris de múscul s'han aïllat utilitzant la metodologia estàndard emprada al nostre laboratori (ref.113,114) lleugerament modificada d'acord amb Rustin i cols (ref.115) per a petites quantitats de múscul esquelètic humà, tal i com el nostre grup de recerca ha reportat en altres estudis (ref.92,116,117). El *pellet* de mitocondris ha estat resuspès en un medi amb 20mM Tris (pH 7.2), 250mM sucrosa, 40mM KCl i 2mM EGTA. Tots els passos s'han realitzat a 4°C. La concentració proteica mitocondrial ha estat determinada mitjançant el mètode de Bradford (ref.112). Els temps aproximat entre la biòpsia muscular i l'aïllament mitocondrial (preparat per a iniciar els estudis bioquímics) ha estat d'uns 45 minuts.

- Incubació dels mitocondris amb CO:

En el grup D, les mostres de mitocondris han estat incubades a 37°C durant 5 minuts en diferents ambients corresponents a aire enriquit amb diverses concentracions de CO. D'acord amb diverses taules de conversió entre COAE a COHb, dades obtingudes de fumadors, exposicions professionals al CO permeses per la llei i dades de pacients intoxicats per CO, s'ha decidit utilitzar aire sintètic (N₂ 79%, O₂ 21%, CO 0ppm) com a gas control, i concentracions de CO de 50ppm, 100ppm i 500ppm (Linde Abelló[®], Barcelona, Espanya) per les successives determinacions bioquímiques. La incubació de les alíquotes a diferents concentracions de CO s'ha realitzat seguint els procediments estàndard per a exposició de mostres a gasos i d'acord amb la llei de Henry, el medi queda saturat amb cada barreja de gasos.

- Estudi espectrofotomètric de l'activitat enzimàtica:

Aquest estudi bioquímic del funcionalisme mitocondrial consisteix en analitzar les activitats enzimàtiques individuals dels diferents complexos que formen part de la cadena respiratòria mitocondrial mitjançant espectrofotometria (UVIKON 920, Kontron[®], Schlieren, Switzerland). En limfòcits (Figura 2), s'ha determinat l'activitat del complex II (succinat-ubiquinona reductasa), complex III (ubiquinol-citocrom c reductasa) i complex IV (citocrom c oxidasa) de la CRM, així com la de la G3PDH seguint la metodologia de Rustin i cols (ref.115), lleugerament modificada per a la mesura de l'activitat del complex IV (ref.117). L'activitat dels complexos I i V no s'ha mesurat en limfòcits, doncs no es pot determinar amb seguretat en aquest tipus cel·lular (ref.115).

En mitocondris, s'ha determinat l'activitat del complex I (NADH ubiquinona reductasa), complex II (succinat-ubiquinona reductasa), complex III (ubiquinol-citocrom c

reductasa) i complex IV (citocrom c oxidasa) de la CRM, així com la de la G3PDH també seguint la metodologia de Rustin i cols (ref.115), lleugerament modificada per a la mesura de l'activitat del complex IV (ref.117).

Per tal d'evitar eventuais diferències en el contingut mitocondrial de les mostres, els resultats han estat expressats tant en activitats absolutes (nmol e⁻/min/mg proteïna) com en activitats relatives també. Les activitats relatives s'obtenen dividint les activitats enzimàtiques en relació a l'activitat citrat sintasa, un enzim del cicle de Krebs considerat un bon marcador del contingut mitocondrial a la mostra (ref.118). L'activitat citrat sintasa s'ha realitzat espectrofotomètricament seguint el procediment de Rustin i cols. (ref.115).

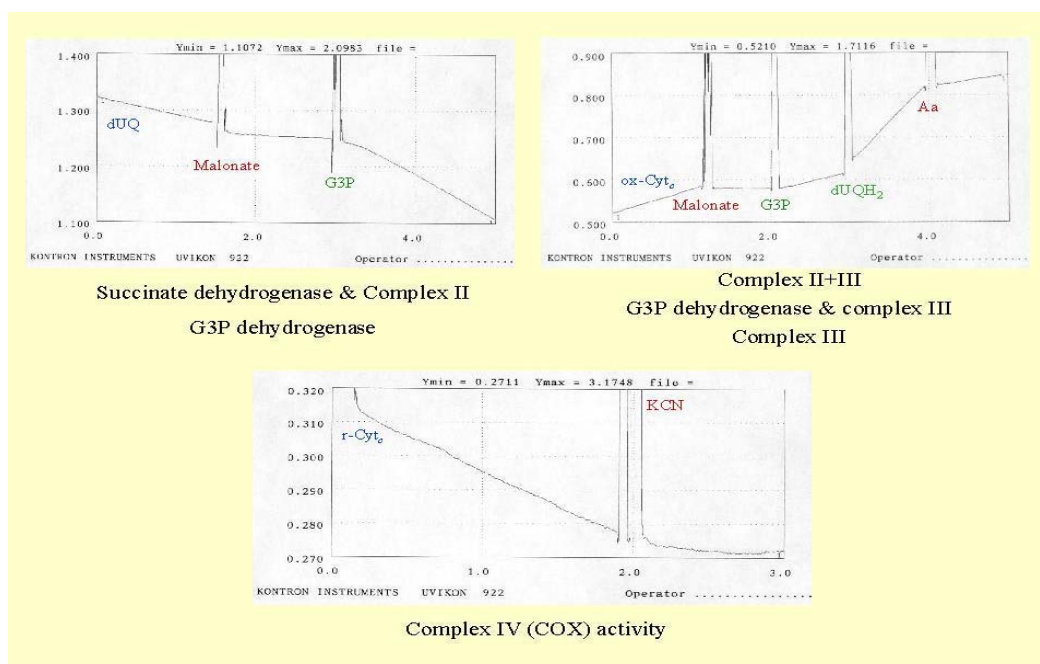


Figura 4. Exemple d'estudi espectrofotomètric d'activitat enzimàtica en limfòcits. La inhibició específica dels complexos que no interessa estudiar i l'addició dels substrats necessaris per al complex que interessa estudiar permet mesurar l'activitat d'un o més complexos enzimàtics. El canvi de coloració d'un substrat o producte acceptor/donador d'electrons es mesura mitjançant espectrofotometria. La velocitat (pendent de la recta) d'aquesta modificació del substrat permet calcular l'activitat enzimàtica que estudiem. Al peu de cada gràfica, el/s complex/os mesurat/s. En blau, els donadors/acceptors d'electrons, en vermell els inhibidors, en verd els activadors del complex enzimàtic. Abreviatures: dUQ (decil-ubiquinona), G3P (glicerol-3-fosfat), dUQH₂ (decil-ubiquinol), r-Cyt_c (citocrom c reduït), KCN (cianur potàssic).

- Estudi polarogràfic de l'activitat oxidativa:

Aquest altre estudi bioquímic del funcionalisme mitocondrial permet la mesura de l'activitat oxidativa de la mostra. Per a aquest menester s'ha utilitzat un polarògraf (Hansatech Instruments Limited[®], Norfolk, England), el qual mesura el consum d'oxigen mitjançant un elèctrode de Clark, d'una mostra de 250µl en una cubeta mantinguda a 37°C. S'ha seguit el procediment de Rustin i cols (ref.115) per a mesurar les activitats oxidatives.

En limfòcits (Figura 5) s'ha estudiat l'activitat oxidativa espontània de la cèl·lula intacta, i en cèl·lules permeabilitzades amb digitonina usant com a substrats piruvat, succinat i glicerol-3-fosfat.

En mitocondris, l'activitat oxidativa s'ha determinat per tal de comprovar la viabilitat dels mitocondris extrets de la mostra de múscul. No obstant, les mesures oxidatives en les mostres incubades a concentracions creixents de CO no s'han realitzat, degut a una qüestió fonamental: Hom sap que la solubilitat dels gasos (llei de Henry) i la possible interacció d'aquests amb altres molècules depenen de la temperatura. A més, cal mantenir els mitocondris a 4°C per a que siguin viables mentre que la incubació caldria fer-la a 37°C amb agitació intensa cosa que afavoreix l'evaporació del medi (amb el consegüent canvi de concentració mitocondrial). És obvi doncs, que aquests resultats no serien interpretables.

Una vegada més, les activitats oxidatives, també s'han expressat en valors absoluts (nmol O₂ /min/mg proteïna) i relatius. Les activitats relatives s'obtenen en dividir l'activitat absoluta per l'activitat citrat sintasa, marcador del contingut mitocondrial (ref.118). La mesura de l'activitat citrat sintasa s'ha realitzat espectrofotomètricament tal i com es descriu a l'apartat corresponent a aquesta tècnica.

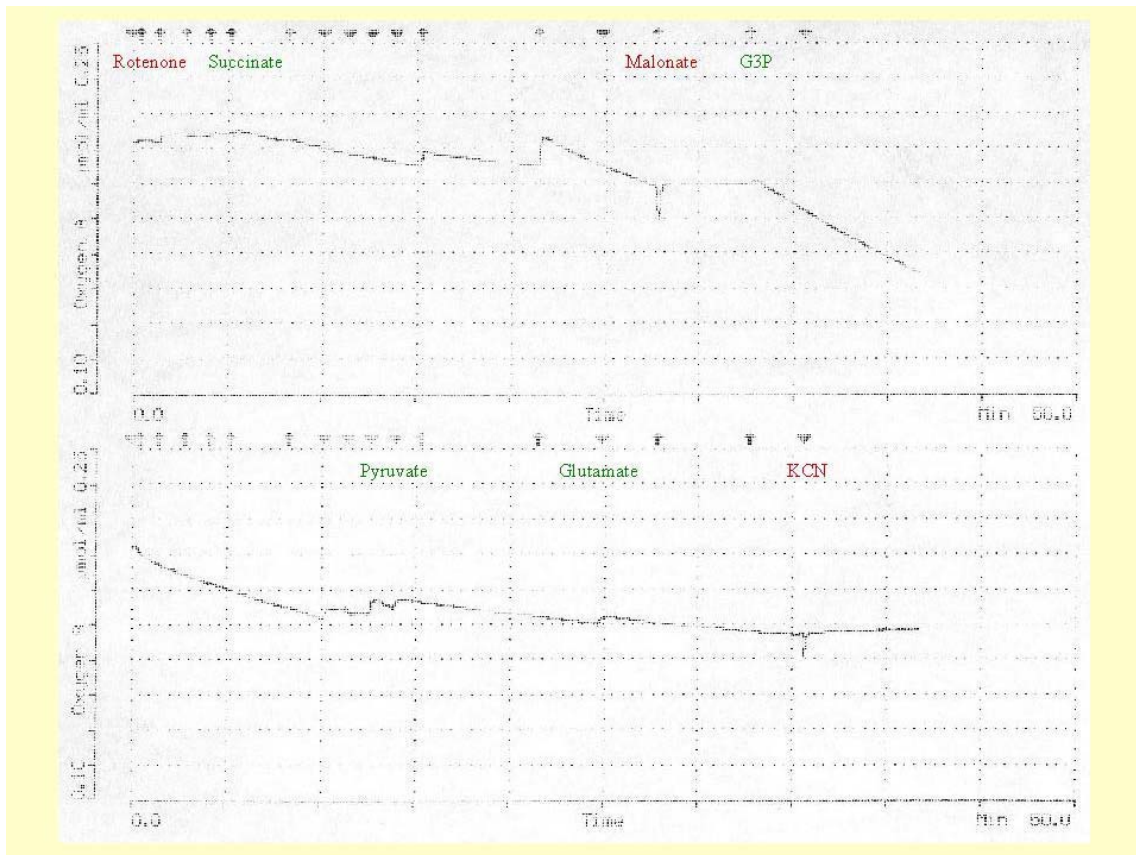


Figura 5. Exemple d'estudi polarogràfic d'activitat oxidativa en limfòcits. A la gràfica superior es mesura l'activitat oxidativa pel succinat com a substrat del complex II. A la gràfica inferior es mesura l'activitat oxidativa cel·lular espontània i pel piruvat i glutamat com a substrats del complex I. En la figura es destaca en vermell els inhibidors i en verd els activadors.

- Estudi de dany oxidatiu:

El dany oxidatiu produït per excés de radicals lliures i espècies reactives de l'oxigen s'ha mesurat determinant la peroxidació de membranes lipídiques (Figura 6). S'ha posat 100μg de proteïna limfocitària en 3ml de sèrum tamponat amb fosfat (PBS) amb 5mM àcid *cis*-parinàric (Molecular Probes[®], Eugene, OR, USA). La pèrdua de fluorescència de l'àcid *cis*-parinàric s'ha mesurat amb un espectrofotòmetre de fluorescència (Hitachi[®] F-2000, Tokyo, Japan) en l'obscuritat a 37°C durant 30 minuts a intervals regulars de 3 minuts. Es

calcula la fluorescència absoluta i la relativa al valor basal (100%). La pèrdua de fluorescència correlaciona de forma positiva amb la peroxidació lipídica (ref.119), de manera que a major pèrdua de fluorescència, major peroxidació.

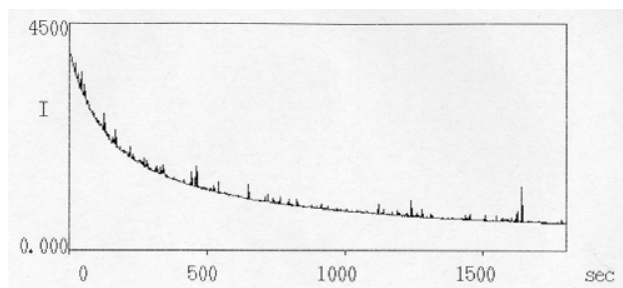


Figura 6. Exemple d'estudi fluorimètric de la peroxidació lipídica en limfòcits. Una gran pèrdua de fluorescència de l'àcid cis-parinàric implica una elevada peroxidació lipídica.

ANÀLISI DE RESULTATS:

Totes les dades obtingudes s'han introduït en una base de dades construïda per a tal finalitat, utilitzant un programa d'aplicació tipus full de càlcul (Microsoft[®] Excel97, Microsoft Corporation, USA). Els resultats s'han expressat com a mitjana \pm desviació estàndard, i en tants per cent. La comparació entre els diferents grups s'ha efectuat mitjançant l'aplicació dels programes estadístics que conté el paquet SPSS 10.0 (SPSS[®] Inc., USA). Els tests emprats per a analitzar les dades es detallen a cada treball d'investigació exposat. Hom ha considerat com a significativa tota diferència trobada amb un valor $p < 0.05$.